



Využití buněčného tisku k přípravě biologického kompozitního materiálu.

Diplomová práce

Studijní program: N3106 – Textilní inženýrství
Studijní obor: 3106T018 – Netkané a nanovláknenné materiály
Autor práce: **Bc. Radek Jirkovec**
Vedoucí práce: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.





Use of cell printing to preparation of biological composite material.

Diploma thesis

Study programme: N3106 – Textile Engineering
Study branch: 3106T018 – Nonwoven and Nanomaterials
Author: **Bc. Radek Jirkovec**
Supervisor: Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.



ZADÁNÍ DIPLOMOVÉ PRÁCE

(PROJEKTU, UMĚLECKÉHO DÍLA, UMĚLECKÉHO VÝKONU)

Jméno a příjmení: **Bc. Radek Jirkovec**

Osobní číslo: **T14000038**

Studijní program: **N3106 Textilní inženýrství**

Studijní obor: **Netkané a nanovláknenné materiály**

Název tématu: **Využití buněčného tisku k přípravě biologického kompozitního materiálu.**

Zadávací katedra: **Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů**

Z á s a d y p r o v y p r a c o v á n í :

- 1) Vypracování literární rešerše týkající se dané problematiky.
- 2) Obeznamení se s funkcí tiskárny, nastavení správné geometrie tiskárny a přesného ovládání.
- 3) Výběr vhodného materiálu (scaffoldu), provedení testů, definování vhodných parametrů pro osazení podkladu biologickým materiálem.
- 4) Zpracování dosažených výsledků a navržení dalších možností pro další výzkum a vývoj materiálů a technologií tohoto typu.

Rozsah grafických prací:

Rozsah pracovní zprávy:

Forma zpracování diplomové práce: **tištěná/elektronická**

Seznam odborné literatury:

1. VENTRA, Massimiliano D. Introduction to Nanoscale science and technology. Boston : Kluwer Academic Publishers, 2004. 611 s. ISBN 1-4020-7720-3
2. LABHASETWAR, Vinod. Biomedical applications of nanotechnology. 1. vyd. New Jersey : John Wiley & Sons, 2007. 257 s. ISBN 978-0-471-72242-7
3. PALSSON, Bernhard. Tissue Enginnering. Tissue Engineering. Florida: CRC Press, 2003. 392 s. ISBN 0-8493-1812-2

Vedoucí diplomové práce:

Ing. Jiří Chvojka, Ph.D.


Katedra netkaných textilií a nanovláknenných materiálů

Datum zadání diplomové práce: **26. března 2015**

Termín odevzdání diplomové práce: **13. května 2016**


Ing. Jana Drašarová, Ph.D.
děkanka




prof. RNDr. David Lukáš, CSc.
vedoucí katedry

V Liberci dne 26. března 2015

Prohlášení

Byl jsem seznámen s tím, že na mou diplomovou práci se plně vztahuje zákon č. 121/2000 Sb., o právu autorském, zejména § 60 – školní dílo.

Beru na vědomí, že Technická univerzita v Liberci (TUL) nezasahuje do mých autorských práv užitím mé diplomové práce pro vnitřní potřebu TUL.

Užiji-li diplomovou práci nebo poskytnu-li licenci k jejímu využití, jsem si vědom povinnosti informovat o této skutečnosti TUL; v tomto případě má TUL právo ode mne požadovat úhradu nákladů, které vynaložila na vytvoření díla, až do jejich skutečné výše.

Diplomovou práci jsem vypracoval samostatně s použitím uvedené literatury a na základě konzultací s vedoucím mé diplomové práce a konzultantem.

Současně čestně prohlašuji, že tištěná verze práce se shoduje s elektronickou verzí, vloženou do IS STAG.

Datum:

Podpis:

Poděkování

Touto cestou bych rád poděkoval vedoucímu mé diplomové práce Ing. Jiřímu Chvojkovi, Ph.D. za ochotu a poskytnutí svého času, cenných rad a věcných připomínek při vypracování této diplomové práce. Poděkování patří také Ing. Martinu Pelclovi a Mgr. Kateřině Strnadové za spolupráci a odborné rady. Poděkování však patří i celé katedře netkaných textilií a nanomateriálů.

Dále poděkování patří také mé rodině za poskytnutou podporu po celou dobu studia.

Abstrakt

Tato diplomová práce se zabývá využitím buněčného tisku k tvorbě biologických kompozitních materiálů. Experiment této práce byl zaměřen na hledání vhodného materiálu, který by bylo možné tisknout a zároveň by umožnil migraci a proliferaci buněk. Pro testování bylo využito želatiny, agarózy, agaru a hydrogelu. Při samotném tisku bylo zjištěno, že všechny materiály lze bez větších potíží tisknout, avšak při následném in-vitro testování bylo zjištěno, že pouze hydrogel umožňuje buňkám proliferaci a migraci dál do vláknitého materiálu.

Klíčová slova

Buněčný tisk, želatina, agaróza, agar, hydrogel

Abstract

This thesis deals with the use of cell printing to the creation of biological composite materials. The experiment of this work has been focused on the search for a suitable material that may be printed while allowing migration and proliferation of cells. For testing were used: gelatin, agarose, agar, and hydrogel. During printing it was found that all materials can be printed without too much difficulty, but during the subsequent in vitro testing it was found that only the hydrogel allows cells to proliferate and migrate further into the fibrous material.

Key words

Cell printing, gelatin, agarose, agar, hydrogel

Obsah

Seznam obrázků.....	10
Seznam tabulek.....	12
Seznam grafů	12
Seznam zkratek a symbolů	13
Úvod.....	14
1. Rešeršní část	15
1.1. Způsoby tisku	15
1.1.1. Inkoustový tisk	16
1.1.1.1. Termický inkoustový tisk.....	16
1.1.1.2. Piezoelektrický inkoustový tisk	17
1.1.2. Vytlačovací tisk	18
1.1.3. Laserový tisk	18
1.2. Materiály.....	19
1.2.1. Hydrogely	21
1.2.2. Deoxyribonukleová kyselina	22
1.3. Využití buněčného tisku	23
1.3.1. Tisk 3D scaffoldu	23
1.3.2. Tisk srdeční chlopně.....	24
1.3.3. Tisk aorty	25
1.3.4. Tisk krevních cév	26
1.3.5. Tisk kožních náhrad	27
1.3.6. Tisk kostí	28
1.3.7. Tisk oční sítnice.....	29
1.3.8. Tisk ledviny	30
1.3.9. Tisk zubů	31
1.3.10. Tisk nervů.....	32
2. Teoretická část	34
2.1. Použité materiály	34
2.1.1. Polykaprolakton.....	34
2.1.2. Želatina	35
2.1.3. Agaróza.....	35
2.1.4. Agar	36
2.1.5. Hydrogel	36
2.2. Popis hodnotících metod.....	37

2.2.1. MTT test	37
2.2.2. Fluorescenční mikroskopie	37
2.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie	38
2.3. Popis použitého zařízení	38
3. Experimentální část	40
3.1. Kalibrace tiskárny	40
3.2. Charakterizace vlákenného materiálu	41
3.3. Testování s destilovanou vodou	42
3.4. Testování s želatinou	43
3.5. Testování s agarózou	46
3.5.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie (FM)	48
3.5.2. Výsledky MTT testu	48
3.6. Testování s agarózou a agarem	50
3.6.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie	50
3.6.2. Výsledky MTT testu	54
3.7. Testování s hydrogelem	56
3.7.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie	57
3.7.2. Výsledky MTT testu	61
3.8. Tisk hydrogelu	62
3.8.1. Charakterizace vlákenného materiálu	62
3.8.2. Postup tisku	64
3.8.3. Výsledky fluorescenční mikroskopie	64
3.8.4. Výsledky MTT testu	66
4. Závěr	67
Použitá literatura	69

Seznam obrázků

Obr. 1. Postup při výrobě tkání. [3]	15
Obr. 2. Technologie buněčného tisku. A) Inkoustový tisk, B) Vytlačovací tisk, C) Laserový tisk. [3]	15
Obr. 3. Proces vytlačení kapky u termické inkoustové tiskárny. [7]	16
Obr. 4. Proces vytlačení kapky u piezoelektrické inkoustové tiskárny. [7]	17
Obr. 5. Ukázka technologie vytlačovacího tisku. [9]	18
Obr. 6. Složení laserové tiskárny. [11]	19
Obr. 7. Porovnání vytištěného plastu a koloidního gelu s tvarovou stálostí. A) ABS plast, B) Výstup při tisku, C, D, E) Koloidní gel s tvarovou stálostí. [18]	23
Obr. 8. 3D scaffold. [19]	24
Obr. 9. Tisk aortální chlopně. A) Zrekonstruovaný model aortální chlopně. B) Znázornění tisku hydrogelu s buňkami SMC. C) Tisk hydrogelu s buňkami VIC. D) Snímek z fluoresceinového mikroskopu první vytištěné vrstvy. E) Vytištěná aortální chlopně. [20]	25
Obr. 10. Postup k vytvoření aorty. [23]	26
Obr. 11. Metoda tisku cév. [24]	27
Obr. 12. Porovnání ošetřené a neošetřené rány v časovém rozmezí. [27]	28
Obr. 13. Schéma zařízení použité při tisku oční sítnice. [30]	30
Obr. 14. Navrhnutí a výroba zubů. A) krysí mandibulární řezák, B) lidská stolička, C, D) scaffoldy s mikrokanálky, E) krysí scaffold zaplněný kolegenem, F) zaplněná lidská stolička kolagenem. [35]	32
Obr. 15. Postup přípravy scaffoldu. A) Sedací nerv, B) Odebraný nerv, C) Vymodelovaný nerv, D) Vytištěný scaffold, E) Rozdělení větví scaffoldu, F) Aplikovaný scaffold. [36]	33
Obr. 16. Strukturní vzorec PCL. [38]	34
Obr. 17. Strukturní vzorec agarózy. [40]	35
Obr. 18. Postup gelace agarózy. [41]	36
Obr. 19. Různé zabarvení při MTT testu. [47]	37
Obr. 20. Buněčná tiskárna systému Prusa	38
Obr. 21. Způsoby ovládání tiskárny: A) Manuální ovládání, B) G-code k automatickému ovládání.	39
Obr. 22. Snímky MB vrstvy z elektronového mikroskopu, při zvětšení 500x.	41

Obr. 23. Snímky MB vrstvy s vylisovaným důlkem.	42
Obr. 24. Testování tiskárny pomocí vody. A) Různé velikosti kapek, B) Linky o různých objemech.	43
Obr. 25. Snímky nanovlákněných PCL vrstev potištěných želatinou.	44
Obr. 26. Kompozitní materiál. A) Želatinové linky na meltblownové vrstvě PCL, B) Nepřevlákněné linky.	44
Obr. 27. Kompozitní materiál. A) Natištěné želatinové kapky o objemu 5 μ l na meltblownové vrstvě z PCL, B) Želatinové kapky převlákněné PCL.	45
Obr. 28. Snímky z FM po 7. testovacím dnu. A) Na snímku jsou zachyceny buňky v agaróze. B) Přejít buněk z agarózy do vlákněného materiálu. C) Buňky v agaróze. .	48
Obr. 29. Snímky z FM po 14. testovacím dnu. A) Snímek s buňkami v agaróze. B) Buňky na vlákněném materiálu. C) Buňky na vlákněném materiálu.	48
Obr. 30. Snímky negativních kontrol ze SEM po 14. testovacím dnu.	49
Obr. 31. Snímky agarózy a agaru z FM po 1. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.	51
Obr. 32. Snímky agarózy a agaru z FM po 4. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.	51
Obr. 33. Snímky agarózy a agaru z FM po 8. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.	52
Obr. 34. Skládané snímky scaffoldu s buňkami v agaróze. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.	53
Obr. 35. Skládané snímky scaffoldu s buňkami v agaru. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.	53
Obr. 36. Fotografie zachycující průběh barvení během MTT testu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.	55
Obr. 37. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 1. testovacím dnu. A) Samotné buňky na vlákněném materiálu, B) Buňky v hydrogelu.	57
Obr. 38. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 4. testovacím dnu. A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.	58
Obr. 39. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 8. testovacím dnu. A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.	58
Obr. 40. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 14. testovacím dnu. A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.	59

Obr. 41. Skládání snímků samotných buněk na vlákněném materiálu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den, D) 14. testovací den.	60
Obr. 42. Skládání snímků buněk v hydrogelu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den, D) 14. testovací den.	60
Obr. 43. Snímky MB vrstvy z elektronového mikroskopu, při zvětšení 500x.	63
Obr. 44. Zkušební vtisknutí obarvené vody do středu objemu meltblownové vrstvy. ...	64
Obr. 45. Snímky buněk v hydrogelu po 1. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.	65
Obr. 46. Snímky buněk v hydrogelu po 4. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.	65
Obr. 47. Snímky buněk v hydrogelu po 8. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.	65
Obr. 48. Snímky testovaného scaffoldu po 14. testovacím dnu. A) Povrchu scaffoldu, B) Střed objemu scaffoldu, C) Spodní strana scaffoldu.	66

Seznam tabulek

Tabulka 1. Způsob tisků jednotlivých tkání. [13].....	20
---	----

Seznam grafů

Graf 1. Histogram použité vlákněné vrstvy.	41
Graf 2. Výsledná absorbance pro vzorky s agarózou.	49
Graf 3. Výsledná absorbance pro agar, agarózu. (* značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi agarem a agarózou).....	54
Graf 4. Výsledné absorbance pozitivních kontrol.	55
Graf 5. Výsledná absorbance pro hydrogel, samotné buňky a pozitivní kontroly (* značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi hydrogelem a samotnými buňkami).....	61
Graf 6. Výsledná absorbance pozitivních kontrol.	62
Graf 7. Histogram použité vlákněné vrstvy.	63
Graf 8. Výsledná absorbance tisknutého hydrogelu.	66

Seznam zkratek a symbolů

AFIRM	Institut ozbrojených sil pro regenerativní medicínu
CNS	Buňky centrálního nervového systému
CT	Počítačová tomografie
DNA	Deoxyribonukleová kyselina
DPC	Buňky zubní dřeně
EC	Endoteliální buňky
FDA	Úřad pro kontrolu potravin a léčiv
FM	Fluorescenční mikroskopie
GGT	Gama-glutamyltransferázová aktivita
HA	Kyselina hyaluronová
HaCaT	Lidské keratinocytové buňky
HSC	Lidské tukové kmenové buňky
MB	Meltblown
MG-63	Kostní buňky
MRI	Magnetická rezonance
MTT	Kolorimetrická zkouška
NIH-3T3	Myší embryotické fibroblasty
PBS	Fosfátový pufr
PC	Pozitivní kontrola
PCL	Polykaprolakton
PEG	Polyethylenglykol
PEGDA	Polyethylenglykol diakrylát
PHEMA	Polyhydroxyethylmethakrylát
PVA	Polyvinylalkohol
RF	Ledvinové fibroblasty
RGC	Gangliové buňky sítnice
RPTEC	Epitelové buňky
SEM	Skenovací elektronová mikroskopie
SMC	Buňky lidského aortálního kořene hladkého svalstva
TetraPA	Tetra-akrylátové deriváty
VIC	Prasečí aortální chlopenní intersticiální buňky
WFIRM	Wake Forest institut pro regenerativní medicínu

Úvod

Budoucností tkáňového inženýrství spočívá ve využití buněčného tisku k tvorbě nových tkání či orgánů, sloužící k nahrazení či regeneraci poškozených orgánů. Metoda tisku nových tkání je velmi slibná z toho důvodu, že počet nemocných lidí převyšuje počet možných dárců. Hlavní výhodou oproti transplantaci tkáně nebo orgánů z jiného člověka či zvířete spočívá v tom, že pokud se využijí přímo buňky člověka, kterému je nutné provést příslušný zákrok, a pomocí těchto buněk se vytvoří požadovaná tkáň, nehrozí odmítavá reakce imunitního systému. Další výhodou tisku spočívá v přesném vymodelování nahrazující tkáně a tedy zajištění její stejné geometrie a stejných anatomických vlastností.

Cílem diplomové práce je obeznámení se s funkčností tiskárny a její následné kalibrace pro dosažení co nejlepších výsledků při samotném tisku. Dalším cílem práce je pomocí in-vitro testů nalézt vhodný materiál, ve kterém by buňky byly zapouzdřeny, bylo možné k nim transportovat živiny, kde by mohly proliferovat a pomocí kterého by bylo možné vyrobit vhodný scaffold.

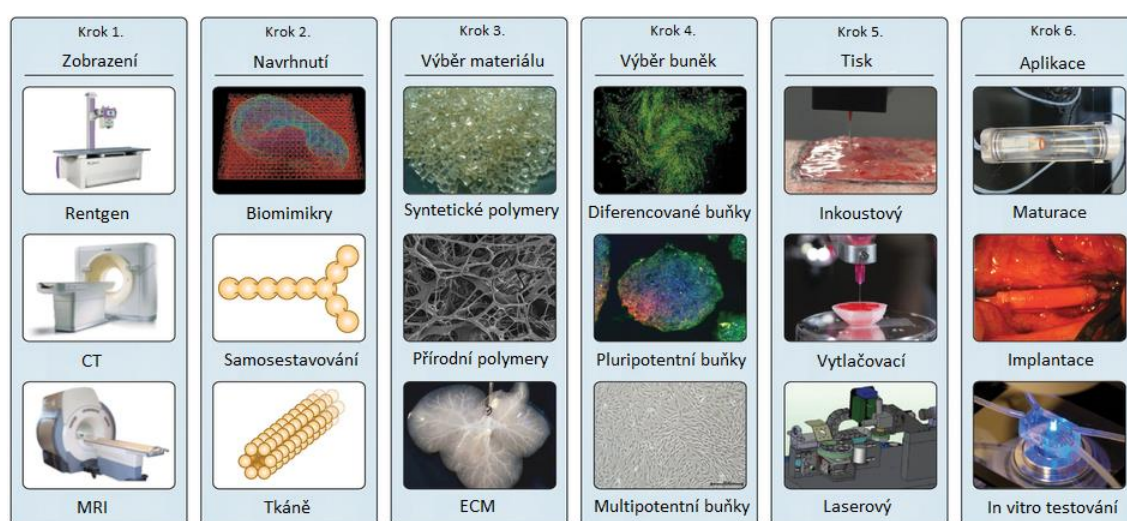
Rešeršní část práce je zaměřena na samotný popis buněčného tisku, jsou zde popsány v současnosti používané způsoby tisku a jejich výhody i nevýhody. Dále je rešeršní část práce zaměřena na popis možného využití buněčného tisku, tedy jaké tkáně a orgány jsou aktuálně tisknuty.

V teoretické části jsou pak popsány jednotlivé materiály použité v této diplomové práci, jsou zde popsány hodnotící in-vitro metody a popis samotné tiskárny, která byla využita k tisku.

Experimentální část obsahuje popis kalibrace tiskárny a základní testování tiskárny pro zjištění jejího možného využití. Součástí experimentální části jsou in-vitro testy použitých materiálů.

1. Rešeršní část

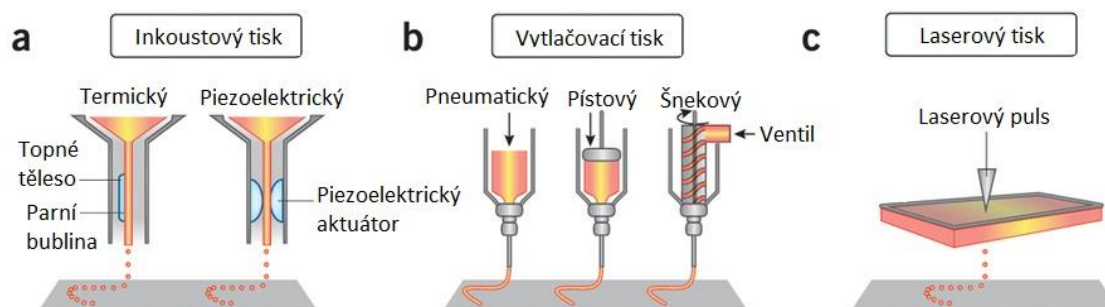
Buněčný tisk lze definovat jako formování jednotlivých vrstev do trojrozměrných struktur pro výrobu tkání nebo orgánů za použití buněk jako stavebních kamenů. Buňky jsou základní strukturální, funkční, a biologické jednotky všech známých živých organismů, kterými lze měřit, vyvíjet a potenciálně kontrolovat materiálové a biologické vlastnosti výsledných tkání nebo orgánů. Konečným cílem buněčného tisku je navrhnout a vyrobit funkční lidské tkáně a orgány vhodné pro regeneraci, opravy a nahrazení poškozených lidských orgánů. [1, 2] Na obrázku 1 je znázorněn celkový postup při výrobě tkání a jejich aplikace.



Obr. 1. Postup při výrobě tkání. [3]

1.1. Způsoby tisku

V současné době existují tři odlišné technologie, které se používají k buněčnému tisku. Všechny tyto technologie jsou znázorněny na obrázku 2.



Obr. 2. Technologie buněčného tisku. A) Inkoustový tisk, B) Vytlačovací tisk, C) Laserový tisk. [3]

1.1.1. Inkoustový tisk

Inkoustový tisk je bezkontaktní reprografická technika, která využívá digitální data z počítače představující obrázek nebo znak, a reprodukuje jej na podložní substrát za použití kapky inkoustu, v našem případě buněk. Inkoustová technologie je taktéž široce využívána v elektronice a mikro-strojírenství pro tištění elektronických materiálů. [4]

Tato technologie spoléhá na využití dávkování buněk stejně, jako je tomu u inkoustového tisku, tedy že buňky jsou uloženy v zásobníku. U této technologie dochází k tištění buď jednotlivých buněk, nebo jejich malých shluků. Metoda inkoustového tisku je rychlá, univerzální a levná. Nevýhodou této metody ovšem je, že je obtížné zajistit vysokou hustotu buněk potřebných pro výrobu pevných struktur. Kromě toho, vzhledem k vysoké rychlosti tisku, dochází také ke značnému poškození tištěných buněk, i když poslední vývoje v této oblasti vedou k významnému zlepšení jejich přežití. [5]

Inkoustový tisk využívá dvě odlišné technologie, termickou nebo piezoelektrickou.

1.1.1.1. Termický inkoustový tisk

Termická inkoustová tiskárna využívá k dávkování kapky inkoustu tlak, který je vytvářen v tiskové komůrce bublinou vypařujícího se inkoustu. Do topného tělíska tiskárny je přiveden na krátkou dobu elektrický proud, čímž se na jeho povrchu začne inkoust vařit a vytvoří se bublina, ve které vzroste tlak a následně je vytlačena kapka z trysky. Proces tisku je znázorněn na obrázku 3. [6]



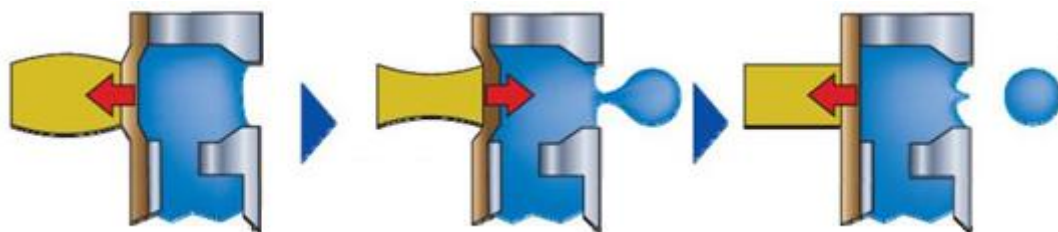
Obr. 3. Proces vytlačení kapky u termické inkoustové tiskárny. [7]

Důležitým parametrem termického tisku jsou vysoké provozní teploty v blízkosti tenkého filmu topného tělesa, které mohou dosáhnout 200-300°C. Doba expozice biomolekuly u topného tělesa je ovšem velmi malá, a to pouze 2 μ s, celý bublinkový cyklus (tedy tvorba a kolaps) a následné proudění tekutiny do trysky trvá 80 - 200 μ s.

Krátká doba cyklu mezi tvorbou kapek a ohřevem kapaliny vede k malému zahřívání a to má za následek nepatrný vliv na zhoršení životaschopnosti biomolekul. Prokázalo to několik výzkumných skupin při tisku biomolekul, jako je deoxyribonukleová kyselina (DNA), avidin-peroxidáza a glukózooxidáza. [8]

1.1.1.2. Piezoelektrický inkoustový tisk

Piezoelektrická tiskárna využívá k vypuzení kapky inkoustu obráceného piezoelektrického jevu. Podstatou piezoelektrického jevu je, že krystal se při svém stlačení elektricky nabije. Boční stěny tryskové komůrky se před tiskem rozšíří díky připojenému napětí, při tisku se však polarita napětí obrátí. To má za následek, že trysková komůrka zmenší objem a část inkoustu vystříkne z trysky. Proces je znázorněn na obrázku 4. [6]



Obr. 4. Proces vytlačení kapky u piezoelektrické inkoustové tiskárny. [7]

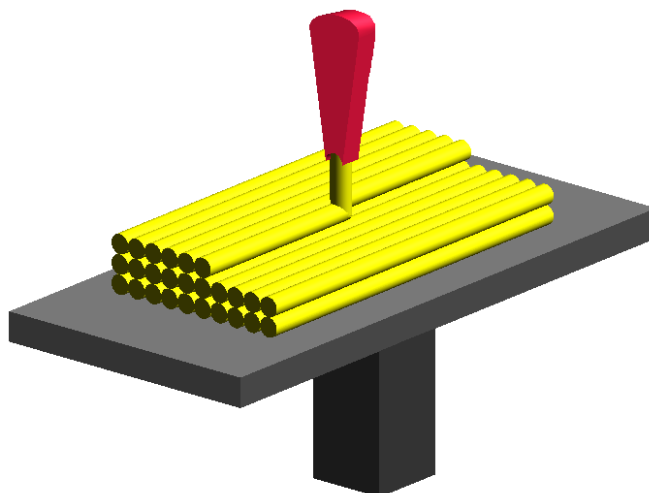
Na rozdíl od termických tiskáren zde nehrozí problém způsobený extrémním teplem, ovšem u tohoto druhu technologie je použitý "inkoust" vystaven vysoké smykové deformaci během procesu tisku, z toho důvodu byla několika vědeckými skupinami zkoumána životaschopnost při ukládání bílkovin během piezoelektrického tisku.

Při zkoumání životaschopnosti u této technologie bylo dosaženo rozdílných výsledků. V jedné studii bylo zjištěno, že smyková deformace vzniklá při tisku nezpůsobuje žádné poškození DNA, nicméně, jiné studie odhalili spojení mezi procesem tisku a následnou ztrátou životaschopnosti buněk, v důsledku toho byla stanovena hranice dávkování $2,5 \cdot 10^4 \mu\text{m}^3 \mu\text{s}^{-1}$, pod kterou nebylo zjištěno žádné poškození. [8]

1.1.2. Vytlačovací tisk

Druhá technologie využívá extruzi k usazení částic do podpůrného prostředí. Extruze může být provedena buď pomocí pístu, šneku nebo pneumaticky.

Mnohobuněčné agregáty jsou uloženy do podpůrného prostředí podle počítačem generované šablony v souladu s topologií požadované biologické struktury. Výhodou této technologie je, že částice bio-inkoustu představují malé trojrozměrné fragmenty tkáně. Buňky z této technologie jsou ve fyziologicky relevantním uspořádání, jsou spojeny se svými sousedy a mohou zajistit přenos důležitých molekulárních signálů. Jedno z možných uspořádání je znázorněno na obrázku 5. Metoda využívá rané vývojové mechanismy, jako je například splnutí tkání a třídění buněk. Nevýhodou této technologie jsou poměrně vysoké náklady na tiskárny. [5]



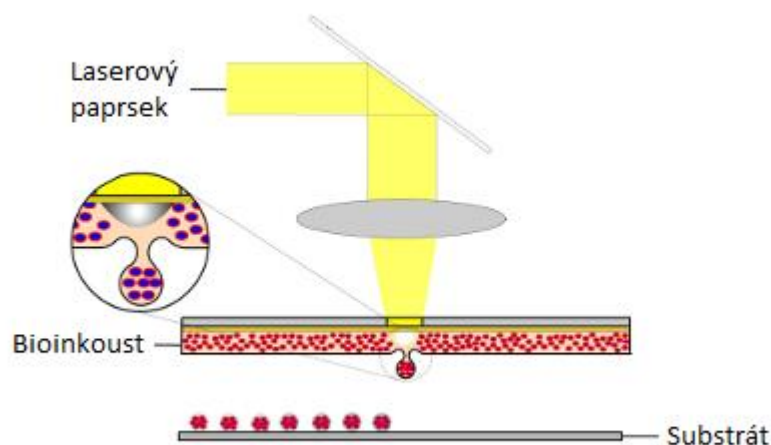
Obr. 5. Ukázka technologie vytlačovacího tisku. [9]

1.1.3. Laserový tisk

Laserový tisk je rozvinutá technika, která umožňuje tisk různých materiálů s vysokým stupněm přesnosti a prostorového rozlišení. V případě tisku kapalin je laserový paprsek zaměřen a absorbován na rozhraní mezi transparentním substrátem a tenkým filmem dárcovského materiálu, který bude uložen na substrátu receptoru. Laserový tisk je používán pro celou řadu materiálů: z jednoduchých vodných roztoků glycerolu, až na složitější materiály, jako jsou nanočásticové inkousty používané pro elektrody v tranzistorech, nebo polymery, používané pro chemické senzory. Laserový tisk se ovšem používá i pro tisk biologických materiálů, jako jsou roztoky pro biosenzory biomolekul nebo živých buněk pro aplikace tkáňového inženýrství.

U buněk z laserového tisku nebylo pozorováno, že by docházelo ke zhoršení jejich bio-funkčních vlastností. [10]

Typická laserová tiskárna, která je zobrazena na obrázku 6, je složena z laserového paprsku zaměřeného na lištu z průhledného skla, která je potažena tenkou vrstvou bioinkoustu. Příjímací substrát je umístěn na vzdálenost několik stovek mikrometrů od lišty. Fyzikální princip laserové tiskárny je založen na generování bioinkoustového filmu do hloubky kavitace, jejíž expanze a imploze způsobuje tvorbu trysky.



Obr. 6. Složení laserové tiskárny. [11]

Experimentální nastavení pro vysoké rozlišení a vysoký výkon vyžaduje brát v úvahu mnoho parametrů tisku v souvislosti s vlastnostmi laserového pulsu (vlnová délka, trvání impulzu, opakovací frekvence, energie, průměr paprsku), bioinkoustových vlastností (viskozita, tloušťka, povrchové napětí), a stejně tak vlastnosti podkladového substrátu. [12]

1.2. Materiály

Pro buněčný tisk se využívá řada buněk, jejich druh závisí na typu tištěné tkáně a na použitém způsobu tisku. V tabulce 1 je znázorněn typ tkání, způsob jejich tisku, typ buněk a podpůrné materiály, které se pro tisk používají.

Tabulka 1. Způsob tisků jednotlivých tkání. [13]

Tkáň	Technika	Typ buněk	Materiály
Srdeční chlopeň	Vytlačovací tisk	<i>Intersticiální buňky aortální chlopně</i>	Kyselina hyaluronová
		<i>Buňky hladkého svalstva</i>	Želatina
Myokardiální tkáň	Vytlačovací tisk	<i>Progenitorové buňky</i>	Alginát
Krevní cévy	Inkoustový/laserový tisk	<i>Endotelové buňky</i>	Fibrin
		<i>Buňky hladkého svalstva</i>	
		<i>Mezenchymální kmenové buňky</i>	
	Vytlačovací tisk	<i>Endotelové buňky</i>	Kolagen
		<i>Svalové buňky srdeční</i>	Agaróza
		<i>Buňky hladkého svalstva</i>	Alginát
		<i>Fibroblast</i>	
Muskuloskeletální tkáň	Inkoustový/laserový tisk	<i>Kmenové buňky svalové tkáně</i>	Fibrin
		<i>Myoblast</i>	
		<i>Mezenchymální fibroblast</i>	
	Vytlačovací tisk	<i>Stromální buňky</i>	Aragóza
		<i>Endoteliální progenitorové buňky</i>	Alginát
		<i>Endogenní kmenové buňky</i>	Hydroxylapatit Polykaprolakton
Nervy	Inkoustový/laserový tisk	<i>Embryonální kmenové buňky</i>	Soy agar
		<i>Pyramidové buňky</i>	Kolagen
		<i>Prekurzorové buňky</i>	Fibrin
	Vytlačovací tisk	<i>Nervové kmenové buňky</i>	
		<i>Hematopoetické kmenové buňky</i>	Aragóza
		<i>Schwannovy buňky</i>	
Kůže	Inkoustový/laserový tisk	<i>Kožní fibroblasty</i>	Kolagen
		<i>Epidermální keratinocyty</i>	

1.2.1. Hydrogely

Hydrogely se vzhledem ke své jedinečné biokompatibilitě, flexibilním metodám syntézy, a požadovaným fyzikálním vlastnostem, používají jako materiály pro mnoho aplikací v regenerativní medicíně. Hydrogely mohou být použity jako scaffold, který poskytuje strukturální integritu tkáním, dávkování léčiv a bílkovin tkáním a kulturám. Dále mohou sloužit jako lepidla či bariéry mezi tkání a povrchem. [14]

Hydrogely mohou být vyrobeny z prakticky jakéhokoliv polymeru rozpustného ve vodě, to zahrnuje širokou škálu chemických skladeb a množství fyzikálních vlastností. Kromě toho, hydrogely mohou být připraveny v různých fyzických formách, včetně mikročástic, nanočástic, povlaků a filmů. [15]

Bio-technologie tisku vyžaduje hydrogel se specifickými vlastnostmi, včetně rychlé tvorby gelu se zesilujícím mechanismem vhodným pro použití v místě rány. Hydrogel musí být nejen neimunogenní, ale také musí být schopný podporovat odpovídající buněčnou aktivitu. Je požadován hydrogel, který má vhodné mechanické vlastnosti, krátkodobou stabilitu, je biologicky odbouratelný v dlouhodobém horizontu, podporuje buněčnou migraci, proliferaci a umožňuje naroubování k endogenní tkáni. Vhodný hydrogel, musí také splňovat příslušné regulační, obchodní a finanční aspekty, které mohou být schváleny úřadem pro kontrolu potravin a léčiv (FDA). [16]

Hydrogely mohou být charakterizovány na základě jejich odvození a složení jako syntetické, biologické nebo hybridní.

Syntetické hydrogely mohou být vytvořeny například z derivátů polyhydroxyethylmethakrylátu (PHEMA), polyethylenglykolu (PEG), nebo polyvinylalkoholu (PVA). Nejvíce používanými syntetickými hydrogely v biomedicínských aplikacích jsou PEG hydrogely, které jsou netoxické, neimunogenní, a jsou schváleny pro různé klinické použití. Další hojně využívaný hydrogel je PHEMA, který je velmi používán pro kontaktní čočky a podávání léků. Výhodou PHEMA jsou jeho mechanické vlastnosti, optická transparentnost a jeho stabilita ve vodě. Další významným syntetickým polymerem je PVA. Hydrogely PVA jsou stabilní elastické gely, které mohou být vytvořeny pomocí opakovaného procesu zmrazování a rozmrazování nebo chemického zesílení. Mohou být vytvořeny jak fyzikálními tak i chemickými metodami zesílení. Fyzikálně zesílené hydrogely PVA jsou biologicky odbouratelné, a proto je lze použít pro různé biomedicínské aplikace. [17]

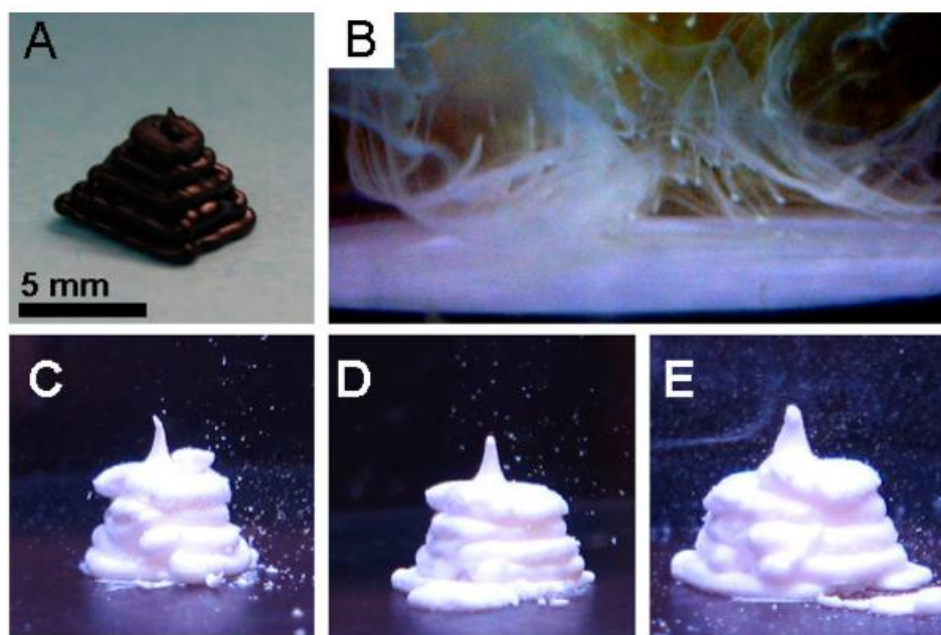
Přírodní hydrogely mohou být odvozeny z polymerů, jako je například kolagen, kyselina hyaluronová (HA), fibrin, alginát, agaróza, a chitosan. V závislosti na jejich původu a složení, mají přírodní hydrogely specifické vlastnosti. Mnoho přírodních polymerů, jako je například kolagen, kyselina hyaluronová, a fibrin, jsou získávány z různých složek savčích extracelulárních maticí. Kolagen je hlavní protein savčí extracelulární matrice, přičemž HA je polysacharid, který se vyskytuje téměř ve všech živočišných tkáních. Alternativně, alginát a agaróza jsou polysacharidy, které jsou získány z mořských řas. Výhodou těchto přírodních polymerů je nízká toxicita a biokompatibilita. [17]

Třetí skupina jsou hybridní hydrogely, které se připravují začleněním biologických subjektů do syntetických hydrogelů. Hybridní hydrogely mohou být vytvořeny tak, aby synergicky kombinovali biologické mechanismy, jako například vysoká afinita a specifická vazeb. Například biologicky aktivní molekuly mohou být inkorporovány do polymerních sítí k výrobě konjugovaných biomateriálů.

Nejčastěji používané peptidy k úpravě hydrogelů jsou aminokyselinové sekvence odvozené od přírodních proteinů. Pomocí těchto materiálů, lze PEG a jiné hydrogely, jako je alginát, modifikovat pro zvýšení buněčné adheze. [17]

1.2.2. Deoxyribonukleová kyselina

Tým vědců z University of Texas v Austinu přišel s myšlenkou, zda by se deoxyribonukleová kyselina (DNA) mohla použít jako lepidlo pro slepení materiálů používaných k výrobě tkání a orgánů. DNA jako lepidlo by tím poskytlo nový, podstatně méně nákladný proces, k vytvoření životaschopných biomateriálů. Tento tým vyvinul nanočástice - polystyrenu a polyakrilaminátu - které byly potaženy DNA. V tomto případě se DNA chovalo jako lepidlo, které drželo materiály dohromady, výsledek je zobrazen na obrázku 7. Výhodou DNA je, že může reagovat předvídatelným způsobem s jinými řetězci DNA, a tím vytvořit tzv. "chytré lepidlo", kterým lze vytvořit koloidní gel s tvarovou stálostí. Pomocí experimentů, byli schopni prokázat, že tyto gely poskytují dostatečné prostředí, ve kterém lze docílit růstu lidských buněk, které následně vytvoří skutečnou tkáň. [18]



Obr. 7. Porovnání vytištěného plastu a koloidního gelu s tvarovou stálostí. A) ABS plast, B) Výstup při tisku, C, D, E) Koloidní gel s tvarovou stálostí. [18]

Výsledkem tohoto experimentu bylo zjištění důležitých výhod při použití DNA jako inteligentního lepidla. První výhoda byla, že po vytlačení ze 3D tiskárny, koloidní gel drží svůj tvar. Druhá výhoda konstrukce vyplývá z DNA vazebných částic, kterými lze kontrolovat strukturu v mikroměřítku. A další výhoda spočívala v tom, že sestava matrice v materiálu může hostit rostoucí buňky. [18]

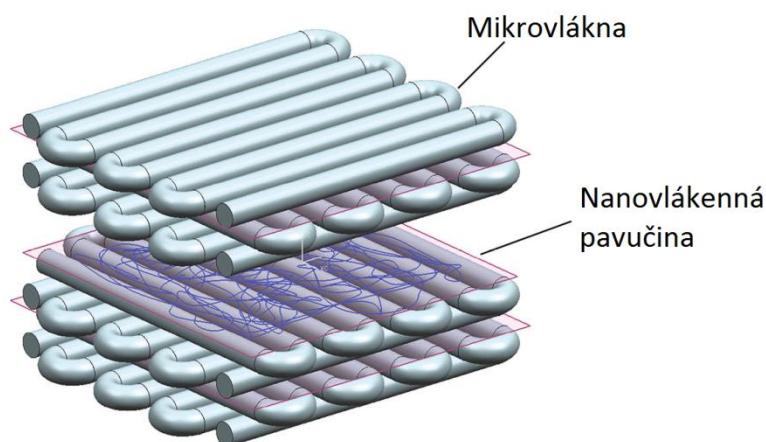
1.3. Využití buněčného tisku

Buněčný tisk má v současné době velké využití. Vědci se pomocí této technologie snaží vytvořit produkty od jednoduchých tkáňových nosičů až po složité systémy – orgány.

1.3.1. Tisk 3D scaffoldu

Pro výrobu bylo vyvinuto zařízení, které se skládalo ze 3D tiskárny a zařízení pro elektrostatické zvlákňování ze stříkačky. K elektrostatickému zvlákňování byl použit roztok polykaprolaktonu (PCL) a k tisku roztok želatiny v kombinaci s alginátem sodným a to v takovém poměru, aby se vytvořil gel.

Při procesu byla nejdříve vytištěna vrstva gelu a následně na ní byla uložena nanovláknenná vrstva. Jak je znázorněno na obrázku 8, výsledkem procesu byl 3D scaffold, složený z vrstev gelových mikrovláken a PCL nanovláken. [19]



Obr. 8. 3D scaffold. [19]

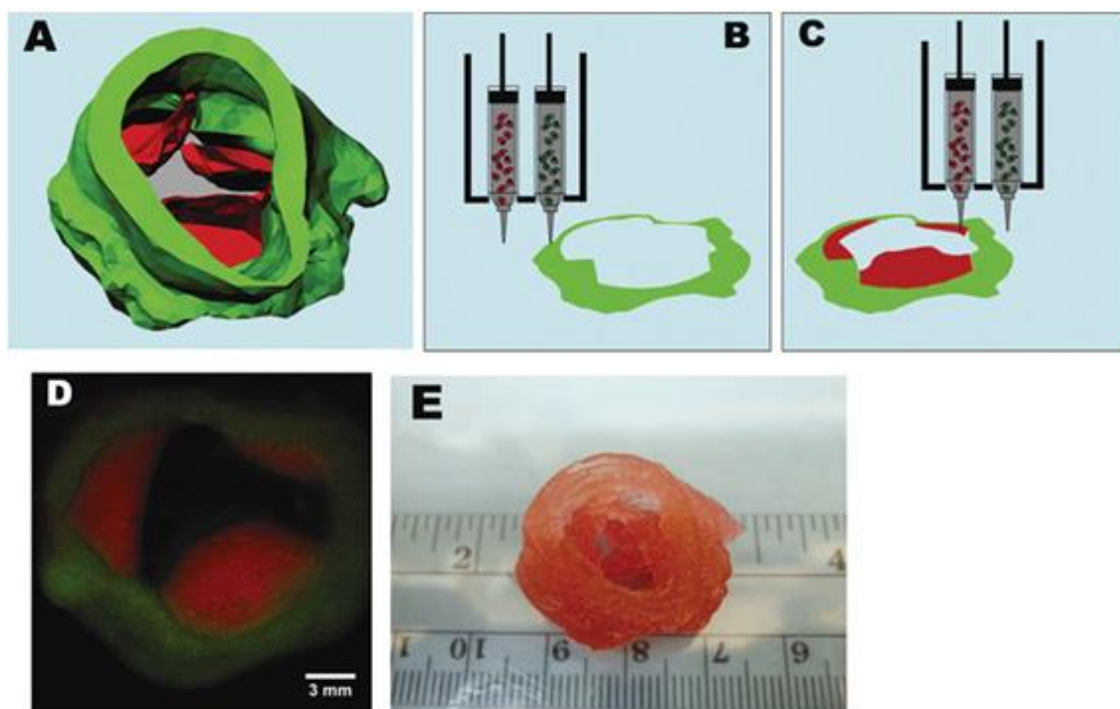
Pro experiment byly použity lidské tukové kmenové buňky (HSC), které byly usazeny na scaffold a následně kultivovány 21 dnů pro studium in vitro. Výsledky kultivace buněk ukázaly, že struktura mikrovláken s řízenými póry umožňují snadný vstup buněk a účinné šíření živin, a nanovláknenná pavučina na navrstveném scaffoldu vede k výraznému zlepšení počátečního uchycení buněk a proliferaci. Společný systém buněčného tisku a elektrostatického zvlákňování vede k lepším biologickým výkonům v aplikacích tkáňového inženýrství. [19]

1.3.2. Tisk srdeční chlopně

Srdeční chlopně jsou ventily zajišťující jednostranný tok krve v srdci. Zvláště důležitá je aortální chlopeň, protože usměrňuje krev aortou a koronárními tepnami. Účinnost chlopně závisí na její složité anatomické geometrii a heterogenní tkáňové biomechanice.

Pro test byly použity prasečí aortální chlopenní intersticiální buňky (VIC) a buňky lidského aortálního kořene hladkého svalstva (SMC). Buňky pro udržení své geometrie a mechanické integrity během vytlačování a síťování, byly zapouzdřeny v želatině hydrogelu. Přesnost tisku díky tomu byla zhruba 84,3% a buňky jím byly rovnoměrně rozděleny po celé tištěné tkáni.

Vytištěná aortální chlopeň, která je znázorněna na obrázku 9, vykazovala jak stejnou geometrii, tak i stejné anatomické vlastnosti srovnatelné s původní chlopní. [20]

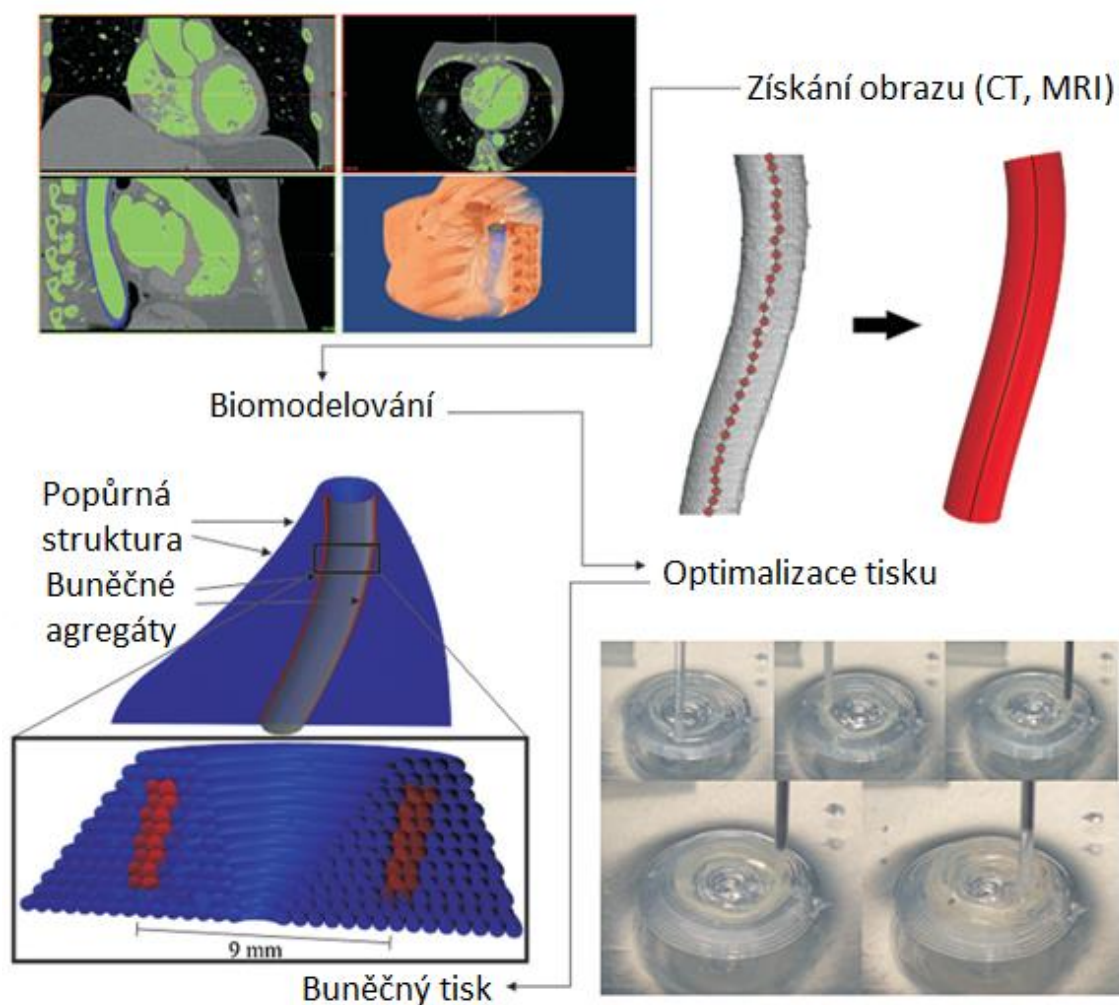


Obr. 9. Tisk aortální chlopně. A) Zrekonstruovaný model aortální chlopně. B) Znáznornění tisku hydrogelu s buňkami SMC. C) Tisk hydrogelu s buňkami VIC. D) Snímek z fluoresceinového mikroskopu první vytištěné vrstvy. E) Vytištěná aortální chlopně. [20]

1.3.3. Tisk aorty

Aorta je hlavní tepna v lidském těle, jejímž úkolem je rozvádět okysličenou krev z levé srdeční komory do organismu. [21] Průměr aorty je většinou mezi 1,0 – 3,0 cm, přičemž tloušťka její stěny se pohybuje od 2 - 3 mm. Vzhledem k tomu, že aorta vystupuje z levé srdeční komory a sestupuje, až do dutiny břišní je její délka velice rozdílná, délka se tedy pohybuje mezi 30 – 65 cm. [22]

Z důvodu velkých rozměrových škál je celá technologie založena na přímém zkopírování původní nahrazované aorty, přičemž je nejdříve získán model z počítačové tomografie (CT) nebo magnetické rezonance (MRI). Tento model je dále použit k získání geometrických a topologických informací o cílové vaskulární tkáni. Druhý krok slouží k vytvoření počítačového modelu, který je pak rozložen na plátky a předložen tiskárně, celý postup je znázorněn na obrázku 10. Důležitým krokem bylo vypočtení množství potřebných buněčných agregátů a podpůrných struktur pro jednotlivé plátky. V tomto experimentu byly použity myší embriotické fibroblasty a jako podpůrný materiál byl použit hydrogel. [23]



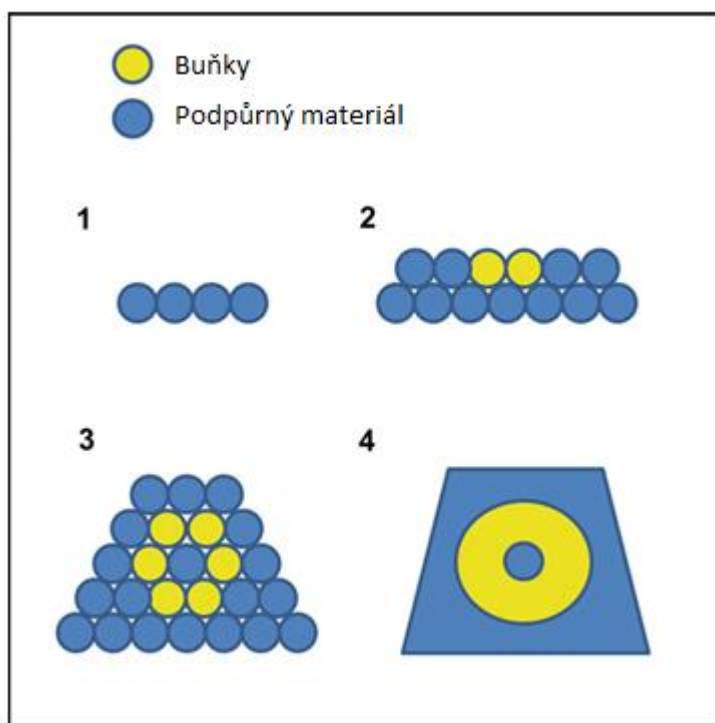
Obr. 10. Postup k vytvoření aorty. [23]

1.3.4. Tisk krevních cév

Tkáňové inženýrství cévních štěpů je potenciální alternativní zdroj k získání autograftů krevních cév, štěpů, a xenoimplantátů. Pro usnadnění vývoje bioarteficiálních cév byly použity deriváty polyethylenglykolu (PEG) s odlišnou délkou řetězců, TetraPEG8 a TetraPEG13, které byly syntetizovány z tetraedrických derivátů pentaerythritolu. Tyto TetraPEG deriváty byly přeměněny na tetra-akrylátové deriváty (TetraPA), které byly následně použity k zesílení kyseliny hyalurované a derivátů želatiny do vytlačovatelných hydrogelů k usnadnění tisku tkání.

Hydrogely zesílené pomocí TetraPA vykazovaly významně vyšší modul pružnosti ve smyku, v porovnání s PEG diakrylátem (PEGDA). Tyto tužší hydrogely mají reologické vlastnosti vhodnější pro tisk suspenze s vyšší hustotou buněk. Deriváty TetraPA také vykazovaly lepší podporu růstu buněk a proliferaci.

K experimentu s TetraPA byly použity buňky NIH-3T3, které byly vytištěny do tubulární tkáňových konstruktů vrstva po vrstvě, jak je znázorněno na obrázku 11. Při měření životaschopnosti bylo zjištěno, že tištěné buňky byly schopny přežít v kultuře až 4 týdny s pouze malou úmrtností. [24]



Obr. 11. Metoda tisku cév. [24]

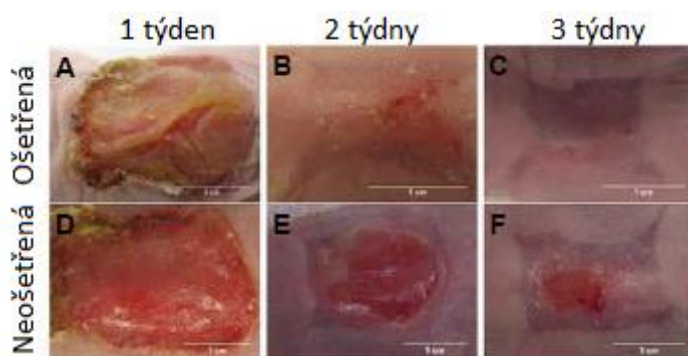
1.3.5. Tisk kožních náhrad

V současné době existuje silná poptávka po plně funkčních kožních náhradách pro různé aplikace. Pro uzdravení rozsáhlých popálenin, velkých a hlubokých ran, se využívá kožní štěp, jeho použití je však omezeno počtem a velikostí dárcovských míst, navíc estetické nebo funkční výsledky jsou často špatné. Z tohoto důvodu je využíván buněčný tisk, který umožňuje výrobu kůže se všemi potřebnými buňkami v jejich specifickém mikroprostředí a s příslušnými funkcemi. [25]

Jedná se o uspořádání vitálních buněk pomocí laserové tiskárny do mnohobuněčných transplantátů analogicky k nativnímu archetypu a tvorbě tkání pomocí těchto buněk. Za tímto účelem, byly fibroblasty a keratinocyty zapouzdřeny v kolagenu, a následně vytištěny jako jednoduchý příklad pro kožní tkáň.

Tento experiment byl proveden s myšími embriotickými fibroplasty (NIH-3T3) a lidskými keratinocytovými buňkami (HaCaT), které byly vloženy do kolagenu a následně vytištěny vrstva-po-vrstvě do jednoduchého 3D modelu jako příklad pro kožní tkáň. [26]

Další experiment byl proveden ve Wake Forest Institutu pro regenerativní medicínu (WFIRM) a na Institutu ozbrojených sil pro regenerativní medicínu (AFIRM). Pro tento experiment byla vyvinuta tiskárna, která ukládala buňky přímo na poškozenou ránu, aby se mohla hojit rychleji. Experiment byl proveden se dvěma skupinami myší, přičemž pouze na jednu skupinu byla aplikována vytištěná kožní tkáň. Rozdíl mezi těmito skupinami byl ohromný. Jak je vidět na obrázku 12, ošetřené myši měly po dvou týdnech téměř vyléčené rány, zatímco u neošetřených myší byla rána ještě otevřená. [27]



Obr. 12. Porovnání ošetřené a neošetřené rány v časovém rozmezí. [27]

1.3.6. Tisk kostí

Kostní tkáň, známá jako kost, je vyrobena ze dvou různých konstrukcí; spongiózní a kortikální kosti. Spongiózní, nebo vnitřní část kosti, je houbovitá a má přirozenou pórovitost 50-90%. Ovšem kortikální kost je hustá vnější vrstva kosti s méně než 10% pórovitosti. Oba typy kostí podstupují přestavbu, dospívání, diferenciaci a vstřebávání, které jsou řízeny prostřednictvím interakce mezi osteocyty, osteoblasty, a osteoklasty. Osteoblasty jsou primárně odpovědné za tvorbu nové kosti, zatímco osteoklasty jsou zodpovědné za resorpci staré kosti. Proces, který zahrnuje osteoklasty a osteoblasty je známý jako remodelace kosti, a je zodpovědný za udržování zdravé kosti. [28]

Kost je dobře známá pro své samoléčebné kapacity, přesto lidské tělo není schopno nahradit kostní defekt, pokud je nad kritickou velikost. Velká ztráta kostní hmoty například v důsledku resekce nádoru nebo vysokého rázového traumatu je hlavní příčinou pro opravu kosti a implantace. Dostupnost a funkčnost kostních štěpů je velice limitována pro obnovení normální funkčnosti poškozeného místa. Inertní implantáty selhávají v průběhu času kvůli opakovanému zatížení.

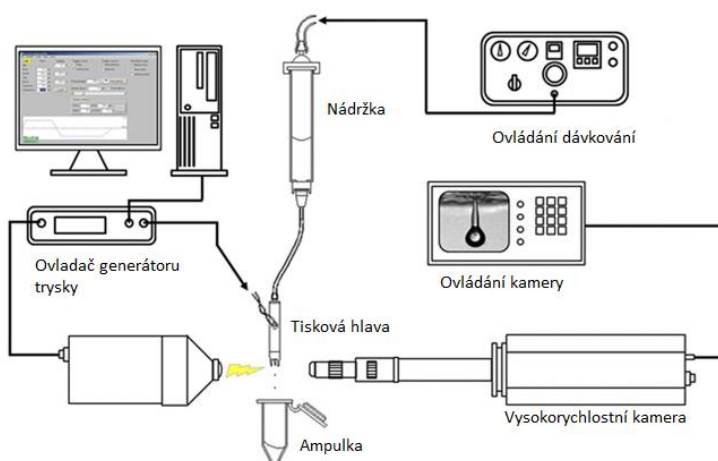
Z tohoto důvodu byla provedena studie, která využívala termického inkoustového tisku za účelem vyhodnocení bioaktivních keramických nanočástic při stimulaci osteogeneze tištěné kostní dřevě odvozené z lidských mezenchymálních kmenových buněk (hMSCs) v poly (ethylenglykol) dimethakrylát (PEGDMA) scaffoldu. Kmenové buňky hMSCs suspendované v PEGDMA byly tištěny společně s nanočásticemi bioaktivního skla (BG) a hydroxyapatitu (HA) při současné polymerizaci, čímž byl tištěný substrát dávkován s vysoce přesným umístěním v trojrozměrných místech.

Buňky hMSCs společně s HA vykazovaly vysokou životaschopnost a došlo ke zvýšení kompresního modulu po 21 dnech v buněčné kultuře. [29]

1.3.7. Tisk oční sítnice

Tým vědců z Univerzity v Cambridge vedl výzkum, zda lze pomocí technologií buněčného tisku vytisknout buňky centrálního nervového systému (CNS), gangliové buňky sítnice (RGC) a gliové buňky. Pro svůj výzkum vědecký tým použil buňky CNS, RGC a gliové z dospělé krysy a zkoumal vliv na jejich přežití a růst v kultuře. Celý tento výzkum je důležitý krok ve vývoji tkáňových štěpů pro regenerativní medicínu, a může pomoci při léčení slepoty.

Tým došel k závěru, že RGC a gliové buňky mohou být úspěšně vytisknuty pomocí piezoelektrické tiskárny, schéma je znázorněné na obrázku 13. Zatímco u tiskárny, která využívá technologii inkoustového tisku, bylo zjištěno, že se snižuje populace buněk v důsledku sedimentace během tisku. Důležité však je, že životaschopnost buněk nebyla ovlivněna samotným procesem tisku. K tomuto závěru došlo porovnáním počtu tištěných a netištěných RGC a gliových buněk, při kterém nebyl zjištěn žádný významný rozdíl v jejich přežití. [30]



Obr. 13. Schéma zařízení použité při tisku oční sítnice. [30]

1.3.8. Tisk ledviny

Tkáň ledviny se skládá ze tří typů lidských buněk, a to z epitelových buněk (RPTEC), ledvinových fibroblastů (RF), a endoteliálních buněk (EC). Ve společnosti Organovo byl proveden experiment k vytvoření ledviny. Při tomto experimentu všechny vytištěné buňky udržovaly správnou formu, a byly schopny přežít dva týdny při in vitro testování. Pomocí imunohistochemické analýzy bylo zjištěno mezibuněčné spojování epitelových buněk, rozsáhlá tvorba cévních struktur a zachování stabilní vrstvené struktury po celou dobu in vitro testování. Epiteliální buňky ve vícevrstevném tubulárním modelu představují cytochrom P450 messenger RNA a vykazovali gama-glutamyltransferázovou (GGT) aktivitu, která je indikátorem funkčních RPTEC. Důležitým poznatkem při experimentu byl fakt, že hladina GGT se zvyšovala i po více než dvou týdnech po zhotovení. [31]

Pro získání funkční ledviny byl proveden i další experiment, při kterém vědci pomocí buněčného tisku úspěšně vytvořili lidskou ledvinu ve zmenšené podobě, u které zůstalo asi 90% z tištěných buněk naživu.

Pro zajištění velkého množství živých buněk, byly lidské ledvinové buňky smíseny s hydrogelem a kultivovány ve velkých objemech vody a výživového materiálu, který tvoří základ vytištěné ledviny. Díky tomuto výživovému gelu byly vytištěné buňky schopny přežít až čtyři měsíce při laboratorním testování.

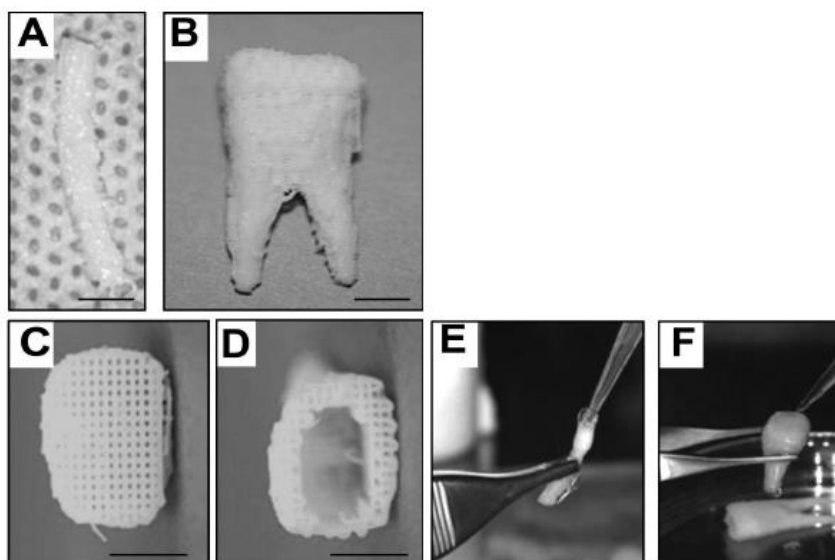
Vytištěné ledviny vykazovaly stejné vlastnosti jako ty skutečné, tedy odbourávat toxiny, metabolizovat a vylučovat tekutiny. [32]

1.3.9. Tisk zubů

Zuby vykazují omezenou možnost opravy v reakci na případné poškození, z toho důvodu poskytují kmenové buňky zubní dřeně zdroj pro nahrazení či opravení poškozeného zubu. Kmenové buňky v jiných částech zubu, jako je periodontia a rostoucích kořenech, hrají důležitou roli ve funkci zubů a jejich vývoji. Zubní kmenové buňky mohou být získány velice lehce, čímž se z nich stal atraktivní zdroj autologních kmenových buněk pro použití při obnově zásadní vlákniny tkáně, při regeneraci periodontie poškozené paradentózou, a pro generování kompletní nebo částečné zubní struktury pro tvorbu biologických implantátů. [33]

Tkáňové inženýrství může poskytnout slibnou léčbu při ztrátě zubů. Byla provedena studie, při které byly získány zubní buničiny z řezáku, špičáku, premolárů a stoličky z jednoletých prasat. Zubní tkáň byly nejprve kultivovány a rozšířeny in vitro pro získání buněk zubní dřeně (DPC), poté byly DPC odlišeny na odontoblasty a osteoblasty. Ústní epitel byl získán z dospělých prasat a kultivován za účelem získání epitelálních buněk. Pro experiment byl vytvořen konstrukt ze třívrstvého scaffoldu ze želatiny-chondroitinu-hyaluronanu, který byl osazen epitelovými buňkami, odontoblasty a osteoblasty, v horní, střední a spodní vrstvě. Tento konstrukt byl implantován celkem osmi prasatům do pravé a levé dolní čelisti alveolárního konektoru. Po 13,5 měsících od implantace bylo provedeno rentgenové a histologické vyšetření pomocí imunohistochemického barvení pro detekci proteinů specifických pro regeneraci zubů. Výsledky ukázali, že sedm prasat mělo kompletní vyvinutý zub s korunkou, kořenem, buničinou, sklovinou, odontoblasty, krevními cévami, a periodontálními vazy. [34]

Na obrázku 14 je znázorněn další výzkum, který využil návrhnutí a výrobu anatomicky tvarovaných lidských a krysích zubních scaffoldů pomocí 3D tisku. Pro experiment byl použit anatomický tvar krysího mandibulárního řezáku a lidské stoličky, které byly vytištěny z poly-ε-kaprolaktonu a hydroxyapatitu. Vytištěné scaffoldy obsahovaly mikrokánálky aby mohly být osazeny buňkami a procesu angiogeneze. Experiment byl proveden se směsí stromatu a kostního morfogenetického proteinu, který byl dodán v kolagenu. Tato směs byla vpravena do mikrokanálek scaffoldu krysího řezáku a lidské stoličky, a následně proběhla želatinace. [35]



Obr. 14. Navrhnutí a výroba zubů. A) krysí mandibulární řezák, B) lidská stolička, C, D) scaffoldy s mikrokanálky, E) krysí scaffold zaplněný kolagenem, F) zaplněná lidská stolička kolagenem. [35]

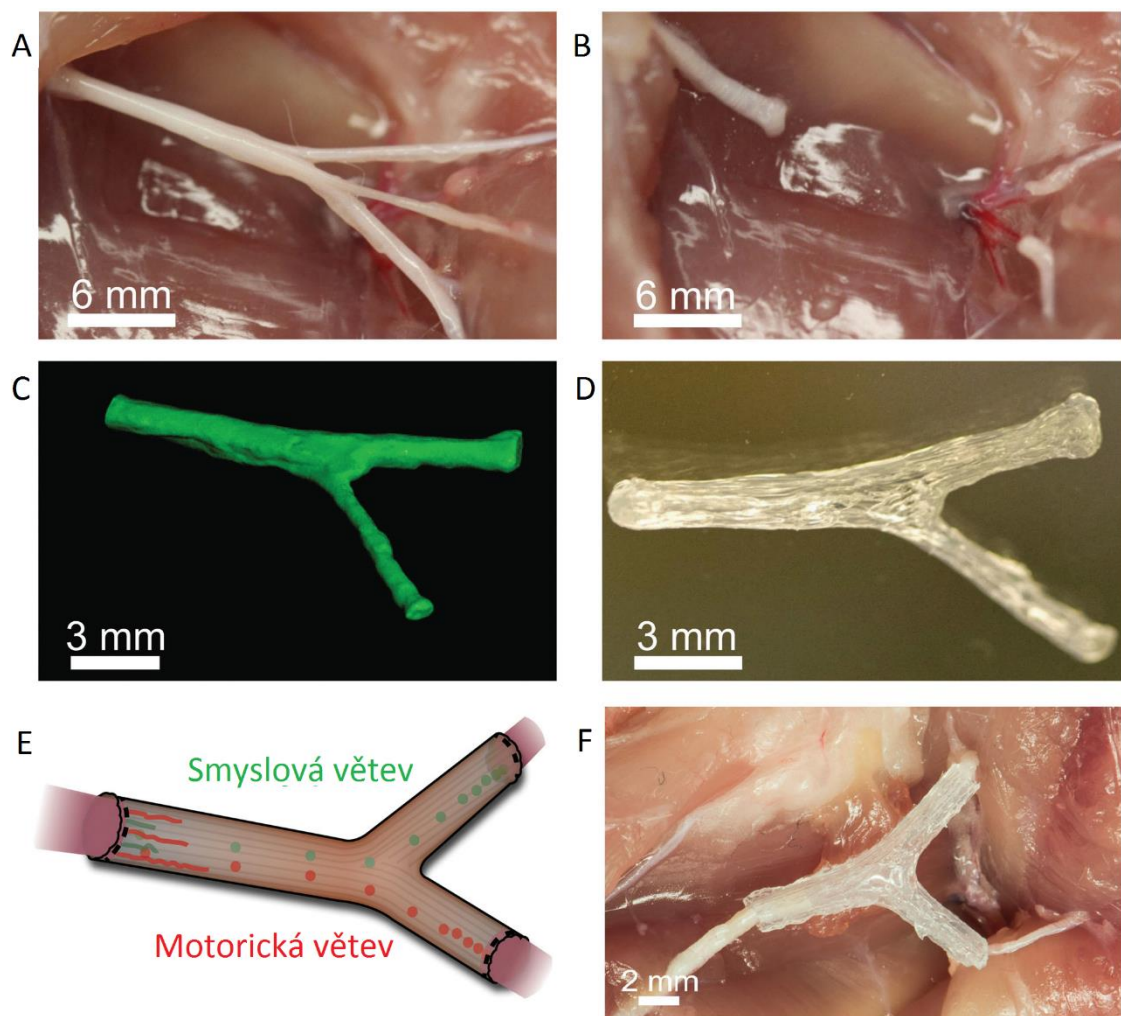
1.3.10. Tisk nervů

Pro test regenerace byla zvolena bifurkace sedacího nervu, protože obsahuje smyslovou a motorickou větev. Samotný nervový scaffold byl vyroben pomocí principu vytlačovacího tisku z 3D modelů, které byly naskenovány z přesné anatomie pacienta, postup přípravy je zobrazen na obrázku 15. Naskenovaný model byl vytištěn včetně biomimetických podnětů (rýh) a specifických biochemických podnětů (prostorově řízených vícesložkových přechodů).

Pro tuto studii byl jako vodicí materiál vybrán silikon, avšak k testu mohly být použity různé neurokompatibilní materiály, včetně polykaprolaktonu, alginátu a kopolymeru kyseliny glykolové a mléčné.

In vitro studie prokázala, že vytištěný scaffold umožňuje fyzikální a biochemické podněty poskytující axonu pokyny a funkčnost chemotaxe / chemokinu.

In vivo studie zkoumající regeneraci poranění krysy, u kterých byla komplexní nervová mezera velká přes 10 mm, ukázala, že pomocí vytištěného scaffoldu bylo dosaženo úspěšné regenerace komplexního zranění nervu, což vedlo ke zlepšení funkčnosti regenerovaného nervu. [36]



Obr. 15. Postup přípravy scaffoldu. A) Sedací nerv, B) Odebraný nerv, C) Vymodelovaný nerv, D) Vytištěný scaffold, E) Rozdělení větví scaffoldu, F) Aplikovaný scaffold. [36]

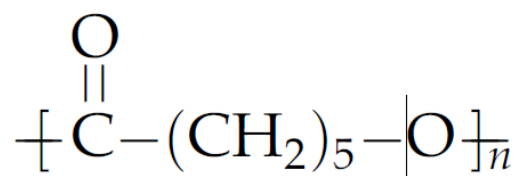
2. Teoretická část

Hlavním cílem této práce je výběr vhodného materiálu, který by sloužil k zapouzdření buněk a umožnil jejich následnou proliferaci. Z toho důvodu jsou v teoretické části práce popsány jednotlivé materiály, které byly použity při experimentech. Dále jsou zde popsány využití hodnotící metody a v poslední řadě je zde také uveden popis použitého zařízení k samotnému tisku.

2.1. Použité materiály

2.1.1. Polykaprolakton

Polykaprolakton (PCL), jehož strukturní vzorec je na obrázku 16, je biodegradabilní, hydrofobní, semikrystalický, termoplastický polymer jehož krystalinita má tendenci klesat s rostoucí molekulovou hmotností. Nejčastěji se připravuje otevřením kruhu polymerací ϵ -kaprolaktonu za použití různých aniontových, kationtových a koordinačních katalyzátorů. PCL má teplotu skelného přechodu (T_g) $-60\text{ }^{\circ}\text{C}$ a teplotu tání pohybující se v rozmezí mezi 59 a $64\text{ }^{\circ}\text{C}$. Průměrná molekulová hmotnost vzorků PCL se může obecně měnit od 3000 do 80000 g/mol . [37, 38]



Obr. 16. Strukturní vzorec PCL. [38]

Při pokojové teplotě je PCL rozpustný v chloroformu, dichlormethanu, tetrachlormethanu, benzenu, toluenu, cyklohexanonu a 2-nitropropanu. Má nízkou rozpustnost v acetonu, 2-butanonu, ethylacetátu, dimethylformamidu a acetonitrilu. PCL je nerozpustný v alkoholu, petroletheru a diethyletheru. [37]

2.1.2. Želatina

Želatina je definována jako produkt, který se získává částečnou hydrolýzou kolagenu odvozeného z kůží, pojivových tkání a kostí zvířat.

Hlavní suroviny používané při výrobě želatiny jsou hovězí kosti, hovězí kůže a vepřové kůže, k přípravě však lze použít i drůbež a ryby. Cizorodé látky, jako jsou minerály (v případě kostí), tuků a albuminoidů (nalezených v kůži), se odstraní chemickou a fyzikální úpravou, čímž se získá vyčištěný kolagen. Takto upravené materiály se pak hydrolyzují na želatinu, která je rozpustná v horké vodě.

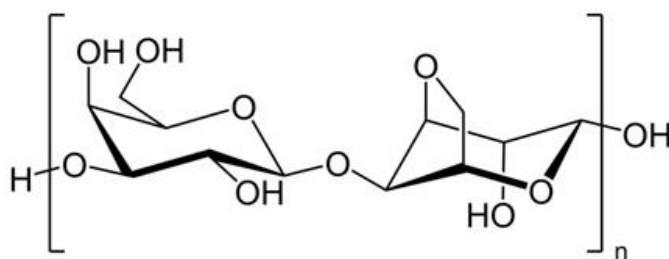
Želatina je téměř bez chuti a zápachu. Jedná se o křehkou pevnou látku se slabě žlutou barvou. Želatina obsahuje 8-13% vlhkosti a má relativní hustotu 1,3-1,4.

V případě že jsou želatinové granule namočený do studené vody, hydratují a vznikají nabobtnalé částice. V okamžiku jejich zahřátí se nabobtnalé částice rozpustí za vzniku roztoku. Chování želatinových roztoků je ovlivněno teplotou, pH, obsahem popela, způsobem výroby, teplotní historií a koncentrací.

Dvě z nejužitečnějších vlastností želatiny síla gelu a viskozita se postupně snižují s dlouhodobým ohřevem v roztoku přibližně nad 40 °C. Degradace může však nastat také důsledkem extrémního pH a proteolytickými enzymy, včetně těch, které mohou vyplývat z přítomnosti mikroorganismů. [39]

2.1.3. Agaróza

Agaróza, jejíž strukturní vzorec je na obrázku 17, je přečištěný hydrogel izolovaný z červené řasy. Jedná se o polysacharid, který se skládá ze střídajících se β -D-galaktózových a 3,6-anhydro- α -L-galaktózových jednotek. [40, 41]

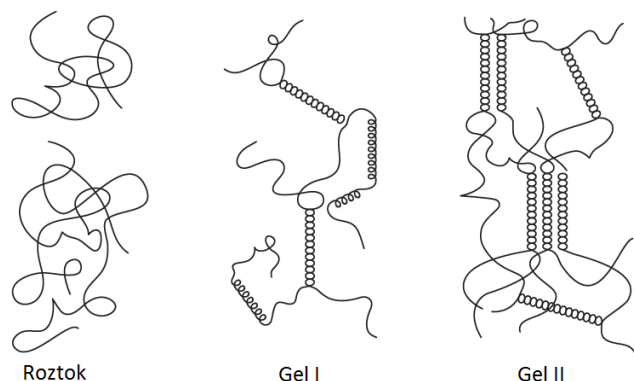


Obr. 17. Strukturní vzorec agarózy. [40]

Agaróza vykazuje vysokou hysterezi, teplota gelovatění se pohybuje v rozmezí od 32 - 45 °C, a rozsah teplot tání je obvykle 80 - 95 °C. [40]

Jedním z nejdůležitějších faktorů, které přispívají k úspěchu agarózy jakožto antikonvenčního média je její schopnost vykazovat vysokou pevnost gelu i při koncentracích nižších než 6%.

Mechanismus gelování agarózy, který je znázorněn na obrázku 18, zahrnuje posun od náhodného klubka v roztoku do dvojité spirály v počátečních fázích gelace, až do svazků zdvojených helixů v konečné fázi. Průměrná velikost pórů se mění s koncentrací a typem agarózy, ale typicky dosahuje hodnot 100 až 300 nm. [41]



Obr. 18. Postup gelace agarózy. [41]

2.1.4. Agar

Po chemickém složení je agar polysacharid, který je složen z jednotek agarózy a agaropektinu. Vyskytuje se v buněčných stěnách několika druhů červených řas. [42]

Agar při pokojové teplotě zůstává ve fázi pevné - gelovité látky. Taví se při teplotě asi 85 °C, k tuhnutí pak dochází při teplotě 32 až 40 °C.

Agar se obvykle používá při koncentraci 1-2% pro ztužení kultivačního média. Menší množství (0,05 až 0,5%) se používá v médiu pro motility studie a pro růst anaerobních bakterií.

Specifické parametry pro agar využívaný k bakteriologickým účelům patří dobrá průhlednost, kontrolovaná teplota gelace a teplota tání, dobré difúzní vlastnosti, absence toxických bakterií inhibitorů. [43]

2.1.5. Hydrogel

Hydrogely, které jsou podrobněji popsány v kapitole 1.2.1, jsou v současné době vnímány jako ve vodě nerozpustné, zesítené, trojrozměrné síť polymerních řetězců spolu s vodou, která vyplňuje mezery mezi polymerními řetězci. Zesítnění znemožňuje rozpustnost ve vodě a poskytuje požadované mechanické pevnosti a fyzickou integritu.

Hydrogel je velké míře tvořen převážně vodou, její hmotnostní podíl je mnohem větší, než podíl polymeru. Schopnost hydrogelu držet značné množství vody, znamená, že polymerní řetězce, musí mít alespoň mírně hydrofilní charakter.

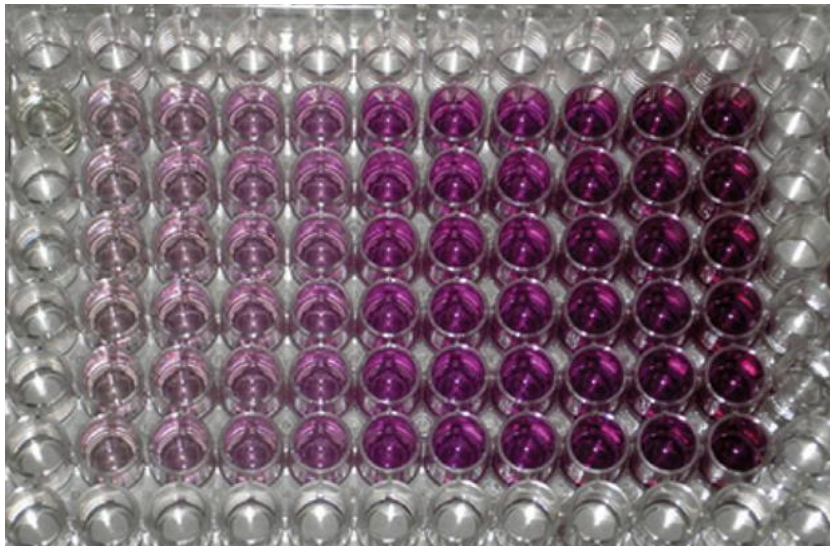
Obecně jsou hydrogely biokompatibilní materiály, které ochraňují buňky, zajišťují transport živin k buňkám či odstraňují buněčné produkty. Jejich nevýhoda spočívá především v dosud vyšší ceně. [44]

2.2. Popis hodnotících metod

2.2.1. MTT test

MTT test je kolorimetrická zkouška pro zjištění viability buněk. Test je založen na redukci tetrazoliové soli MTT (3-(4,5-dimethyl-thiazol-2-yl)-2,5-difenyltetrazoliumbromid) na nerozpustný fialově zbarvený formazan. Množství formazanu je přímo úměrné počtu životaschopných buněk, jeho stupňující se fialové zabarvení je znázorněno na obrázku 19.

Tento ve vodě nerozpustný formazan se rozpouští pomocí isopropanolu a získaný roztok se měří spektrofotometricky, čímž se získá jeho výsledná absorbance. [45, 46]



Obr. 19. Různé zabarvení při MTT testu. [47]

2.2.2. Fluorescenční mikroskopie

Fluorescenční mikroskopie je velmi účinný analytický nástroj pro studium buněk. Fluorescence je luminiscence látky, která je vyvolaná excitací záření.

Některé biologické látky, jako je chlorofyl a některé oleje a vosky mají primární fluorescenci; to znamená, že jsou autofluorescenční. Většina biologických látek však nejsou fluorescenční samy o sobě, a proto musí být spojeny s fluorescenčními molekulami za účelem vytvoření specifických fluorescenčních sond. Ve většině případů se zkoumaný vzorek obarví fluorescenční látkou známou jako fluorofor a osvětlí přes čočku s vyšším zdrojem energie. Světlo je absorbováno fluorofory a následně je z nich emitováno světlo o delší vlnové délce. [48, 49]

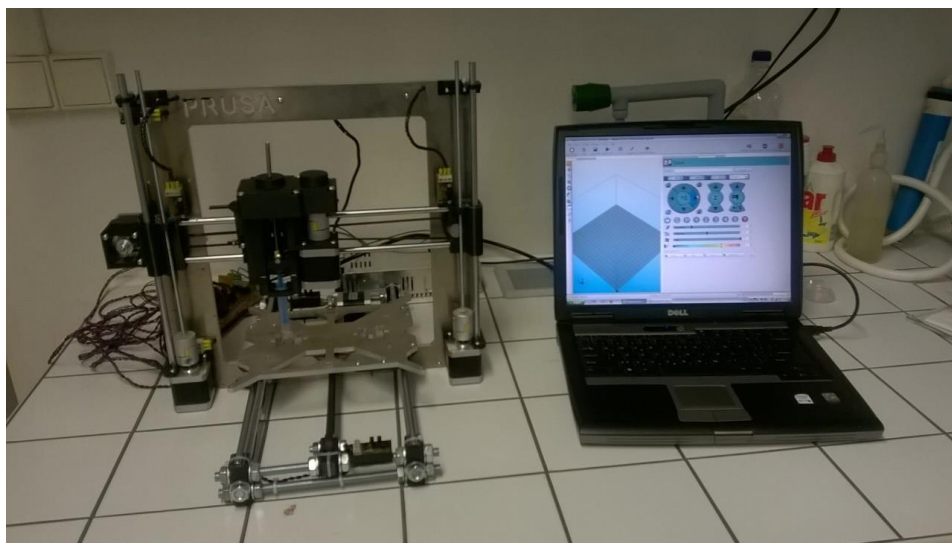
2.2.3. Skenovací elektronová mikroskopie

Skenovací elektronová mikroskopie (SEM) používá jemně zaostřený paprsek elektronů za účelem vytvoření obrazu vzorku o vysokém rozlišení. Elektronová tryska, která se nachází v horní části zařízení, vystřelí elektronový paprsek, který dopadne na pokovený povrch vzorku, z kterého se následně odrazí zpět sekundární elektrony.

Mikroskop se skládá z řady čoček uvnitř vakuové komory. Tyto čočky nasměrují elektrony směrem k vzorku, aby se maximalizovala účinnost. SEM vyžadují vakuovou komoru, aby nedocházelo k interakcím elektronů s atmosférou. [50]

2.3. Popis použitého zařízení

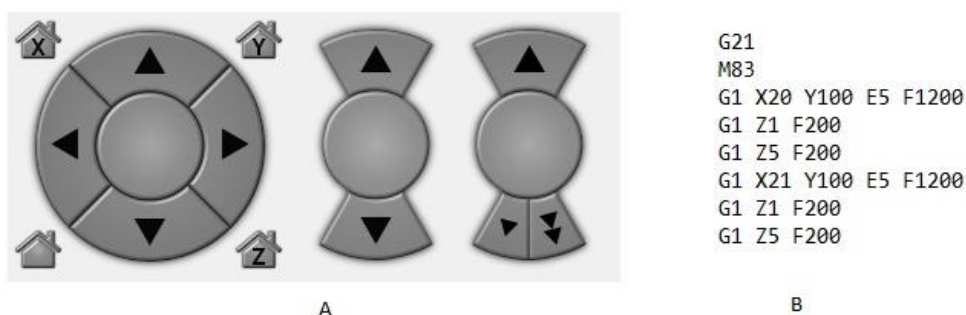
Pro buněčný tisk byla využita 3D tiskárna systému Prusa, na obrázku 20, postavená v rámci disertační práce Ing. Iaroslavem Kovalenkem, která byla upravena na vytlačovací buněčnou tiskárnu.



Obr. 20. Buněčná tiskárna systému Prusa.

Celé zařízení se skládá z 3D tiskárny a osobního počítače, který slouží k monitorování a ovládání systému. Buněčná tiskárna umožňuje ovládání pohybu řídicího modulu injekční stříkačky ve třech osách. Polohovací zařízení os x a y umožňuje jejich nejmenší posun o 0,1 mm, u osy z je nejmenší možný posun o 0,01 mm. K tisku byla využita odnímatelná 2 ml injekční stříkačka o průměru vstřikovací trysky 2 mm.

Ovládací systém se skládá z krokových motorů v každé ose, včetně řízení dávkovacího zařízení injekční stříkačky. Všechny pohyby jsou řízeny počítačovým softwarem Repetier-Host nebo pomocí g-codu, který zajistí úplnou automatizaci procesu. Tento kód je možné získat například ze systému CAD. Ukázka způsobu ovládání je znázorněna na obrázku 21.



Obr. 21. Způsoby ovládání tiskárny: A) Manuální ovládání, B) G-code k automatickému ovládání.

3. Experimentální část

Experimentální část je zaměřená na prvotní kalibraci tiskárny, která měla zajistit její správné fungování. Po provedení kalibrace bylo provedeno základní zjištění možností tisku pouze pomocí destilované vody. Dále pak již bylo provedeno testování tisku jednotlivých materiálů popsaných v teoretické části práce a jejich in-vitro testování.

3.1. Kalibrace tiskárny

Pro řádné fungování tiskárny při tisku materiálů bylo nejdříve nutné zajistit správnou kalibraci tiskárny. Toto testování probíhalo v klasické laboratoři, ve které nebylo nutné tiskárnu sterilizovat, a k testování se používala destilovaná voda a materiály popsány v teoretické části práce.

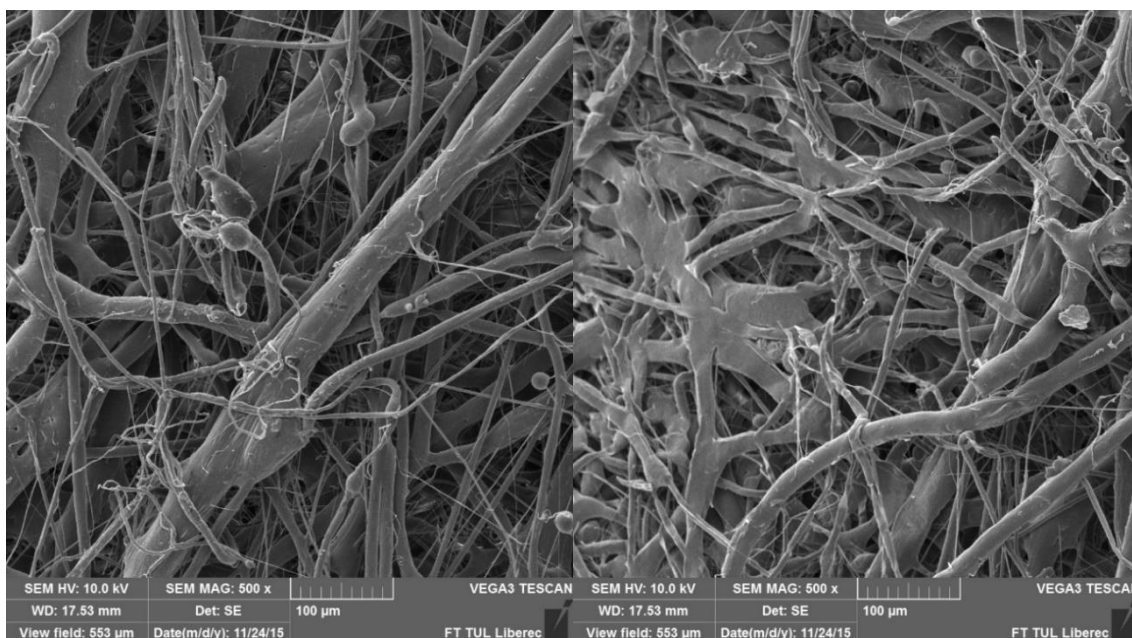
Hlavním krokem bylo nastavení správné geometrie tiskárny. Prvotní problém který se ukázal, byla vyosená vodící tyč z-tové osy a absence mechanického spojení spojek mezi motory a hřídelemi z-tových os. Z tohoto důvodu bylo nutné vodící tyč v horní části uložení z-tové osy povolit a zajistit mechanické spojení spojek mezi motory a ovládacími hřídelemi pomocí sešroubování. Další problém při zdvihu na z-tové ose představovala původní rychlost zdvihu, z toho důvodu bylo nutné rychlost omezit na 90% z původní rychlosti z-tové osy. Použitá rychlost tisku v této práci byla u osy x a y 10 mm / s a u osy z 1,66 mm / s. Toto špatné nastavení geometrie z-tové osy způsobovalo vyosení dávkovacího zařízení a s tím spojené problémy během dávkování destilované vody.

Dalším řešeným problémem bylo vyosení krokového motoru dávkovacího zařízení, který se vlivem vyosení zadrhával o ochranný kryt, a následkem toho docházelo k nerovnoměrnému dávkování. Řešením bylo vybroušení ochranného krytu tak, aby mezi ním a krokovým motorem vznikla dostatečná mezera.

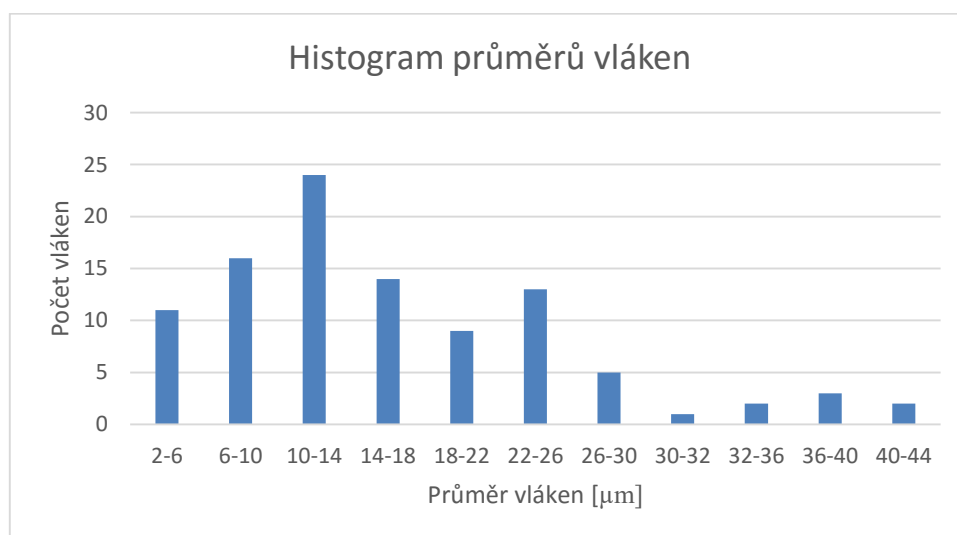
Poslední nutná změna proběhla u zarážky k optickému snímači z-tové osy. Zarážka byla nedostatečně dlouhá pro zachycení optickým snímačem, díky tomuto problému nebylo možné dosednutí dávkovacího zařízení do nulté polohy a tím byl znemožněn i samotný tisk. Z toho důvodu byla ve spolupráci s Ing. Jiřím Šafkou, Ph.D. vytištěna nová delší zarážka, který tento problém eliminovala.

3.2. Charakterizace vláknenného materiálu

Jako podkladový materiál pro nanášení jednotlivých materiálů byl použit vláknenný materiál typu MeltBlown (MB), který byl vyroben z polykaprolaktonu (PCL) o molekulové hmotnosti 45.000 od společnosti Sigma-Aldrich. Morfologie vrstvy je znázorněna na obrázku 22.



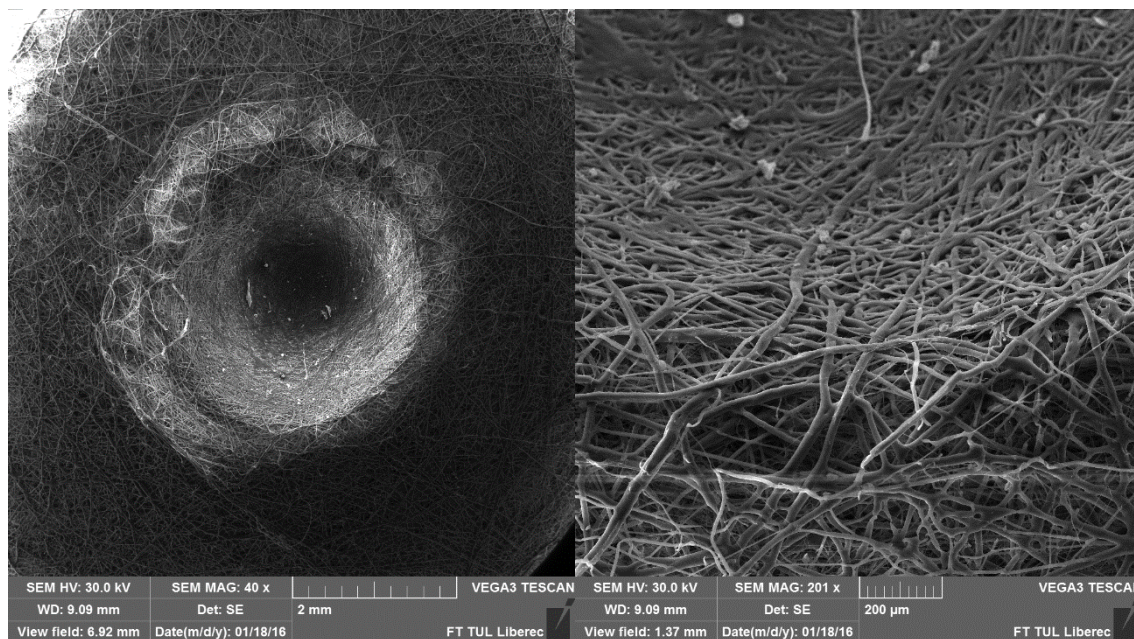
Obr. 22. Snímky MB vrstvy z elektronového mikroskopu, při zvětšení 500x.



Graf 1. Histogram použité vláknenné vrstvy.

Průměr vláken u použité MB vrstvy byl změřen a zprůměrován ze sta měření, na $16,22 \pm 9,12 \mu\text{m}$. Histogram použité vláknenné vrstvy je znázorněn v grafu 1.

Do použité podkladové vlákně vrstvy byly následně vylisovány důlky o průměru 3 mm. Na obrázku 23 je zachycen vylisovaný důlek a detail jeho sklonu. Jak lze z obrázku pozorovat, důlek si i po vylisování ponechává pórovitou strukturu pro následnou migraci buněk.



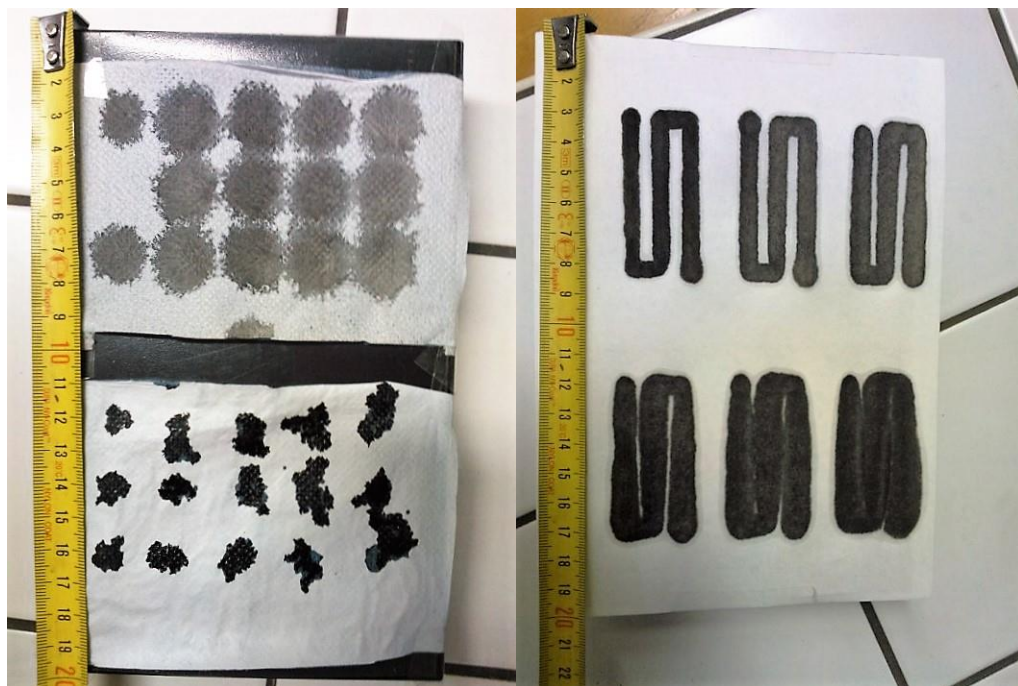
Obr. 23. Snímky MB vrstvy s vylisovaným důlkem.

3.3. Testování s destilovanou vodou

K samotnému tisku byla využita injekční stříkačka o objemu 2 ml s nasazenými injekčními jehlami o průměrech 0,4 mm, 0,6 mm, 0,8 mm a 1,2 mm. Během prvotního testování s destilovanou vodou byly zkoumány možnosti tiskárny, a pro lepší přehlednost vytištěných kapek byla destilovaná voda obarvena pomocí černé tuže.

V první fázi bylo zkoumáno, jak velké kapky lze tisknout. Během testování bylo zjištěno, že pomocí jehly o průměru 0,4 mm bylo možné vytlačit nejmenší možnou kapku o objemu 1,252 µl, a s jehlou o průměru 1,2 mm bylo možné vytvořit kapku 5 µl.

Druhá fáze byla provedena k ověření, zda lze tiskárnou udělat souvislou linku, pro zajištění spojení mezi jednotlivými buňkami a zajištění přenosu důležitých molekulárních signálů. Na obrázku 24 jsou zachyceny kapky o různých velikostech a vytištěné linky.



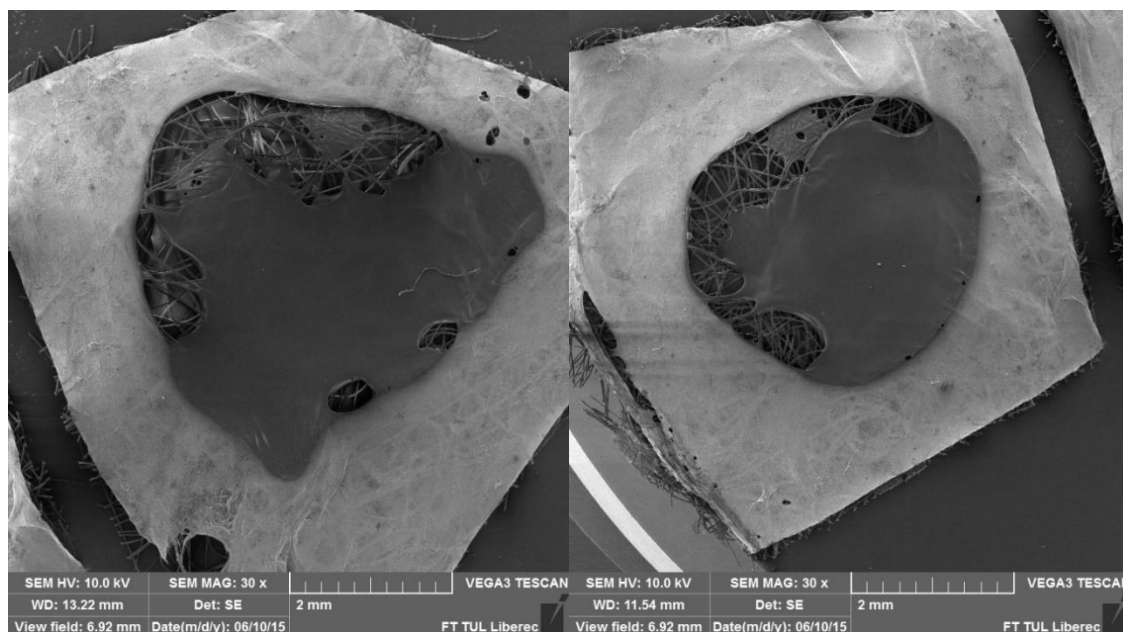
Obr. 24. Testování tiskárny pomocí vody. A) Různé velikosti kapek, B) Linky o různých objemech.

3.4. Testování s želatinou

Po otestování tisku s destilovanou vodou, byl jako možný materiál k zapouzdření buněk zvolena hovězí želatina od společnosti Sigma-Aldrich s katalogovým číslem G9382. K tomuto testování bylo nutné použít injekční jehlu o průměru 1,2 mm, a to z toho důvodu, že při použití jehly o menším průměru docházelo vlivem vysoké viskozity k ucpávání jehly a jejímu následnému stržení ze stříkačky. Dále bylo k injekční stříkačce přidáno vyhřívání, které bylo nastaveno na 37°C, čímž bylo zajištěno, že želatina zatuhla až při samotném vytlačení nikoliv ve stříkačce.

Během testování tisku želatiny s jehlou o průměru 1,2 mm byla stanovena nejmenší možná vytisknutelná kapka na 5 μ l. Testování bylo provedeno se třemi koncentracemi želatiny, a to s 15%, 20% a 25%. Nejlépe se z těchto koncentrací pracovalo s 20%, která měla ideální viskozitu vzhledem k tisku a době zatuhnutí.

První testování tisku želatiny bylo provedeno na nanovlákenou vrstvu z PCL. Na vrstvu byly natištěny nejmenší možné kapky, tedy 5 μ l. Avšak experiment nevedl k uspokojivým výsledkům, protože jak je znázorněno na obrázku 25, želatina nanovlákenou PCL vrstvu rozpustila.



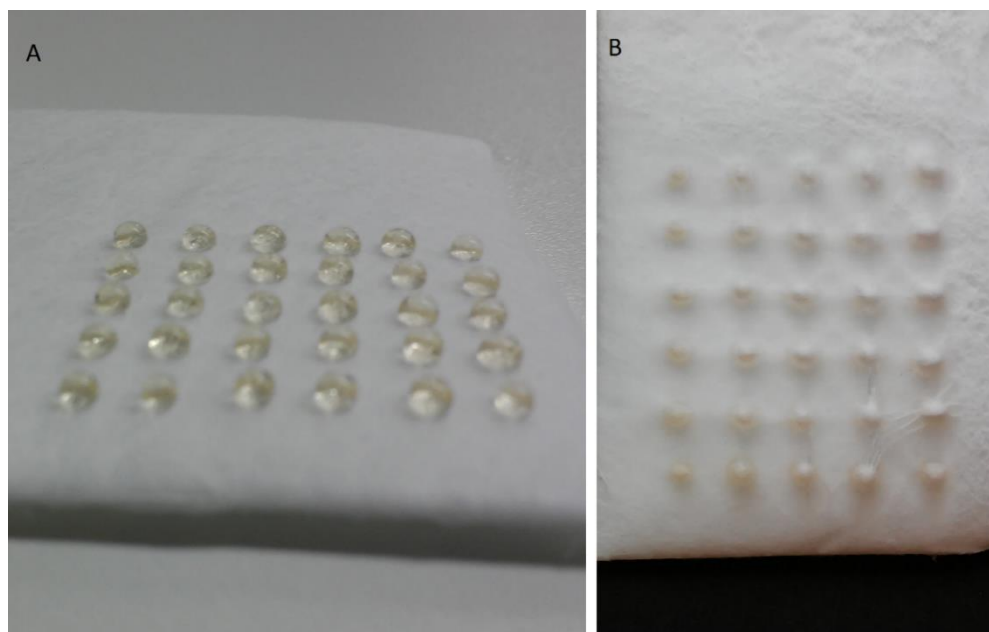
Obr. 25. Snímky nanovláknenných PCL vrstev potištěných želatinou.

Z výše uvedeného důvodu byl experiment změněn, želatina byla nově tištěna na mikrovláknennou meltblownovou vrstvu a následně převlákněna vrstvou PCL nanovláken pomocí elektrostatičkého zvlákňování. Na obrázku 26 jsou zachyceny želatinové linky, kde na každou vytvořenou linku bylo použito 30 μ l želatiny, avšak vlivem velké časové prodlevy mezi tiskem a zvlákňováním nebyly želatinové linky převlákněny.



Obr. 26. Kompozitní materiál. A) Želatinové linky na meltblownové vrstvě PCL, B) Nepřevlákněné linky.

Z tohoto důvodu byl proveden další experiment, tentokrát s 5 μ l kapky. Tyto kapky vlivem nízké prodlevy během tisku a zvlákňování bylo možné převláknit a vznikl tím tak kompozitní materiál složený z mikrovláken, želatinových kapek a nanovláken. Na obrázku 27 jsou zachyceny kapky před a po zvlákňování.



Obr. 27. Kompozitní materiál. A) Natištěné želatinové kapky o objemu 5 μ l na meltblownové vrstvě z PCL, B) Želatinové kapky převlákněné PCL.

Pro použití želatiny k zapouzdření buněk byl proveden biologický experiment, který byl proveden v laboratoři tkáňového inženýrství. Tento experiment byl proveden s nevysterylizovanou želatinou, z důvodu její nemožné sterilizace pomocí autoklávu, při které by želatina denaturovala.

Biologický experiment s nevysterylizovanou želatinou vedl ke zjištění, že takováto želatina je k použití nevhodná, protože při samotném testování nevysterylizované želatiny se v testovaných vzorcích objevila kontaminace a z toho důvodu bylo nutné testování přerušit.

Kvůli problémům spojených se sterilizací želatiny byl zvolen přechod na agarózu, kterou je možné sterilizovat pomocí autoklávu.

3.5. Testování s agarózou

Pro testování s agarózou od společnosti Bioline s katalogovým číslem BIO-41025, byla jako první provedena koncentrační řada, která měla za úkol najít vhodnou koncentraci, která by zajistila vytvoření scaffoldu ve kterém by buňky mohly migrovat do svého okolí.

Zvolené testované koncentrace byly: 0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35% a 0,50%. Při tisku jednotlivých koncentrací byla sledována doba jejich zatuhnutí a pevnost výsledného gelu pro případnou tvorbu trojrozměrných struktur. Z výše uvedených koncentrací se nejlépe k zapouzdření buněk a jejich následnému tisku jevila 0,35% koncentrace, která byla použita pro testování.

Po zvolení vhodné koncentrace byl jako další krok zvolen biologický experiment, který měl za úkol ověření jejího možného použití.

První test byl proveden v rámci cvičení z předmětu tkáňové inženýrství, během tohoto testování bylo připraveno celkem 16 scaffoldů z Melblownové vlákenné vrstvy, která je popsána v kapitole 3.2. Pro MTT test bylo použito 8 scaffoldů, 4 pro testování po 7 dnech a 4 pro testování po 14 dnech, dále pak 2 scaffoldy pro fluorescenční mikroskopii a 2 scaffoldy pro skenovací elektronovou mikroskopii, opět každý pro otestování po 7 a 14 dnech. Pro negativní kontroly, byly celkem použity 4 scaffoldy, 2 pro otestování po 7 dnech, druhé 2 pak pro otestování po 14 dnech. Negativní kontroly byly připraveny pouze s médiem (750 μ l) bez nasazených buněk. Jeden vzorek z testovaného dne, byl použit pro MTT test a druhý pro vytvoření snímku na skenovacím elektronovém mikroskopu.

Testovaný vlákenný materiál byl vyřezán do kruhového tvaru s průměrem odpovídající velikosti jedné jamky, kde plocha použitého 24 well platu byla 1,95 cm². Vystřižené materiály byly sterilizovány pomocí 70% etanolu, ve kterém byly po dobu 30 minut ponořeny. Vysterilizované materiály byly přendány do kultivační destičky a dvakrát propláchnuty pomocí fosfátového pufru (PBS).

K nasazení buněk bylo zapotřebí připravit 0,7% agarózu, která byla připravena v živném médiu a vysterilizována pomocí autoklávu iCanclave při 121°C po dobu 30 minut. Použité médium bylo složeno z: MEM High Glucose, inaktivovaného fetálního bovinního séra, antibiotik, L-Glutaminu, 7,5% NaHCO₃ a z neesenciálních aminokyselin.

Pro vytvoření 0,35% agarózy, byla připravena buněčná suspenze s médiem, v zastoupení 2 ml buněčné suspenze a 3 ml média. V 1 ml buněčné suspenze bylo $1,6 \cdot 10^6$ buněk.

Připravená agaróza byla po vychladnutí ředěna 1:1 buněčnou suspenzí s médiem, čímž vznikl 10 ml roztok 0,35% agarózy, ve které byla koncentrace buněk $3,2 \cdot 10^6$. Takto připravený roztok byl dávkován po 30 μ l do vylisovaných důlků v MB vrstvě, do jedné vrstvy bylo tedy nadávkováno $9,6 \cdot 10^3$ buněk. K testování byly použity kostní buňky MG-63, a použita byla jejich 15. pasáž.

Nanesené buňky v agaróze byly po době zatuhnutí, zality 750 μ l média a vloženy do inkubátoru, kde byly kultivovány při teplotě 37°C a 5% CO₂.

Pro pozitivní kontroly, které byly testovány pomocí MTT testu, byla použita pouze buněčná suspenze s médiem, při testu nebyl použit žádný testovaný materiál.

Scaffoldy inkubované 7 dnů a 14 dnů byly testovány pomocí metabolického MTT testu, fluorescenční mikroskopie (FM) a skenovací elektronové mikroskopie (SEM).

Pro MTT test, bylo do sterilní kultivační jamky pipetováno 750 μ l kompletního média a přidáno 250 μ l roztoku MTT. Do takto připravených roztoků byly následně přeneseny scaffoldy. Připravené kultivační destičky byly vloženy po dobu dvou hodin do inkubátoru.

Během kultivace destičky určené k MTT testu, byly připraveny vzorky pro fluorescenční a elektronovou mikroskopii. Vzorky byly přendány do nových jamek a 2x propláchnuty pomocí PBS. Vzorky určené pro elektronovou mikroskopii byly zafixovány ve 2,5% roztoku glutaraldehydu po dobu 15 minut při 4°C.

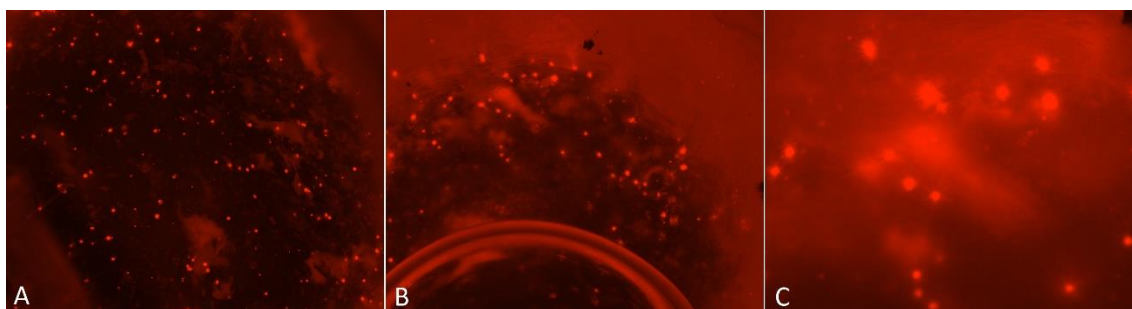
Vzorky pro fluorescenční mikroskopii byly fixovány ve vymraženém metanolu 15 minut při 4°C. Po fixaci byly vzorky určeny k SEM opláchnuty vzrůstající ethanolovou řadou (60, 70, 80, 90, 96, 100%) po 5ti minutách.

Vzorky určeny k FM byly opláchnuty 2x pomocí PBS, a následně barveny propidium jodidem. Barvení probíhalo 10 minut ve tmě, a poté následoval 2x oplach pomocí PBS.

Po skončení inkubace MTT testu bylo médium odsáto a přidáno 1 ml okyseleného isopropanolu. Zabarvený roztok byl přepipetován do čisté 96-jamkové destičky a na spektrofotometru byla změřena absorbance při 570 a 650 nm.

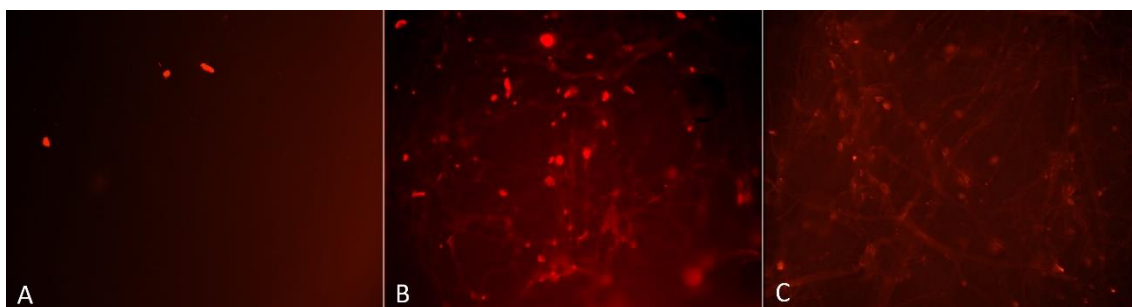
3.5.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie (FM)

Snímky z FM po 7. testovacím dnu jsou zachyceny na obrázku 28. Na obrázku jsou zachyceny buňky jak v agaróze tak i na samotném vlákenném materiálu.



Obr. 28. Snímky z FM po 7. testovacím dnu. A) Na snímku jsou zachyceny buňky v agaróze. B) Přechod buněk z agarózy do vlákenného materiálu. C) Buňky v agaróze.

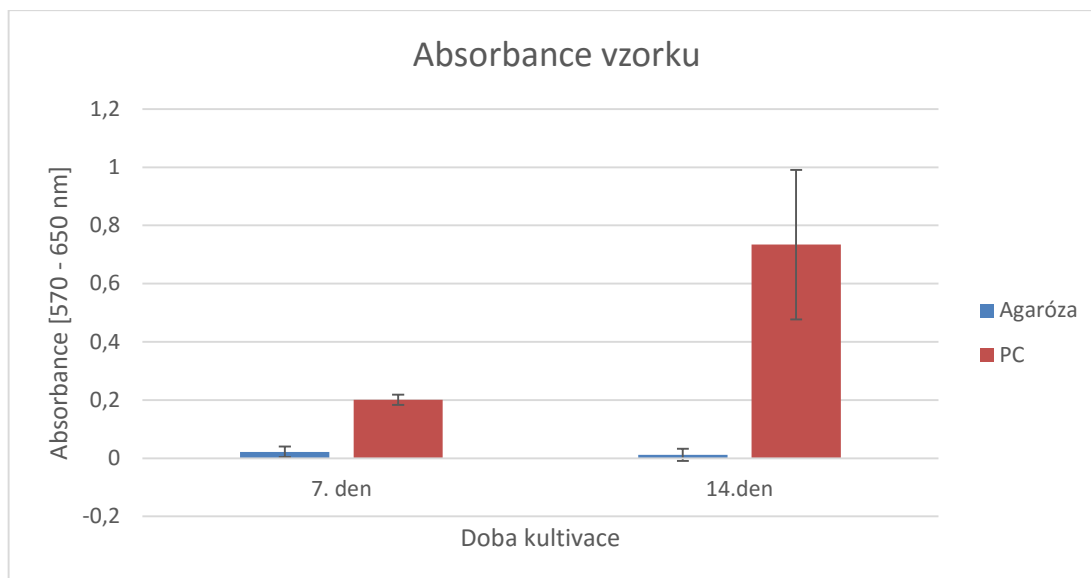
Snímky z FM po 14. testovacím dnu jsou zachyceny na obrázku 29. Při porovnání se snímky ze 7. testovacího dne, buňky při 14. dnu více migrovaly do vlákenného materiálu, avšak poklesl jejich počet.



Obr. 29. Snímky z FM po 14. testovacím dnu. A) Snímek s buňkami v agaróze. B) Buňky na vlákenném materiálu. C) Buňky na vlákenném materiálu.

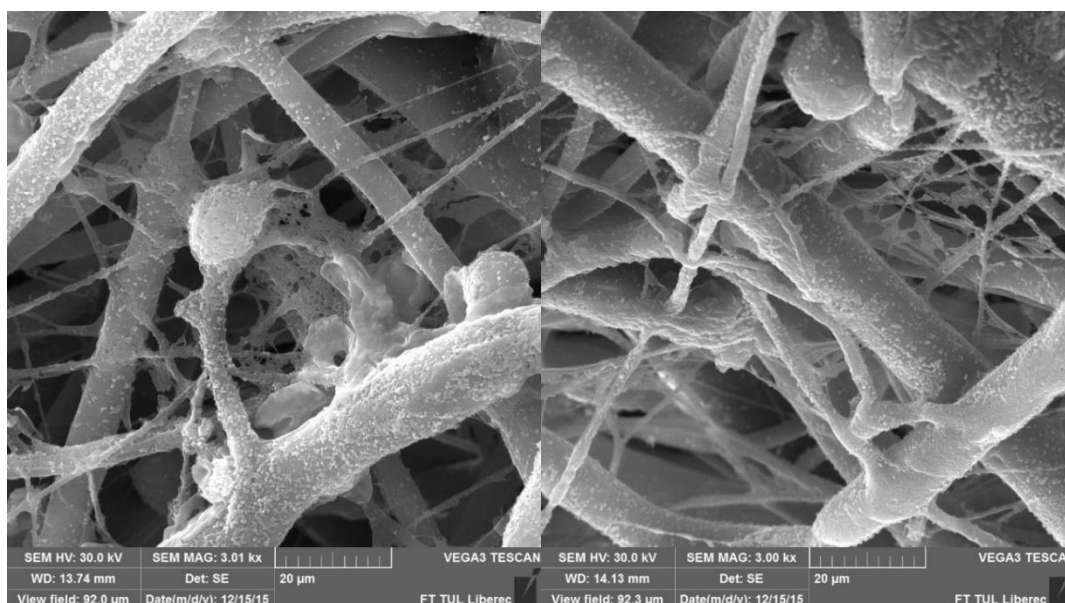
3.5.2. Výsledky MTT testu

Výsledná hodnota absorbance z MTT testu pro použitý vzorek byla získána jako rozdíl vlnových délek 650 a 570 nm. Od těchto odečtených hodnot byla dále odečtena hodnota absorbance negativní kontroly a následně byly vypočtené hodnoty zprůměrovány. Pro získání hodnoty absorbance pozitivní kontroly bylo nutné pouze udělat rozdíl mezi použitými vlnovými délkami a jejich zprůměrování. Výsledné absorbance agarózy a pozitivních kontrol (PC), které značí počet živých buněk, jsou uvedeny v grafu 2.



Graf 2. Výsledná absorbance pro vzorky s agarózou.

Graf výsledků MTT testu, zobrazuje porovnání absorbancí agarózy a pozitivních kontrol pro 7. a 14. den. Červeně jsou znázorněny absorbance pozitivních kontrol, modře jsou zachyceny výsledné absorbance roztoku s agarózou. Výsledné hodnoty absorbance agarózy jsou jak pod mezí stanovitelnosti, tak i pod mezí detekce. Absorbance pro mezí stanovitelnosti byla stanovena na 0,26 a pro mez detekce na 0,08. Navíc jak je zachyceno na snímcích negativních kontrol po 14. testovacím dnu na obrázku 30, vyskytla se zde kontaminace materiálu.



Obr. 30. Snímky negativních kontrol ze SEM po 14. testovacím dnu.

3.6. Testování s agarózou a agarem

Z důvodu kontaminace a absorpance pod mezí detekce při MTT testu byl proveden druhý experiment s agarózou a při tomto testování byl proveden i experiment s dalším materiálem, agarem od společnosti Bio Basic Inc. pod obchodním názvem Agar-A s katalogovým číslem FB0010.

Pro experiment byl znovu použit vlákenný materiál typu Meltblown uvedený v kapitole 3.2 a kostní buňky MG-63, a byla použita jejich 12. pasáž. Pro testování bylo použito 48 scaffoldů, pro každý materiál a testovací den byly použity 4 vzorky pro MTT test, 1 vzorek pro fluorescenční mikroskopii a 1 vzorek pro negativní kontrolu. Nasazení buněk probíhalo podle postupu popsaného v kapitole 3.5 se změnami uvedenými níže.

Pro vytvoření 0,35% agarózy a 0,35% agaru, byla připravena buněčná suspenze s médiem, opět v zastoupení 2 ml buněčné suspenze a 3 ml média. Při tomto experimentu však bylo v 1 ml buněčné suspenze $8 \cdot 10^5$ buněk.

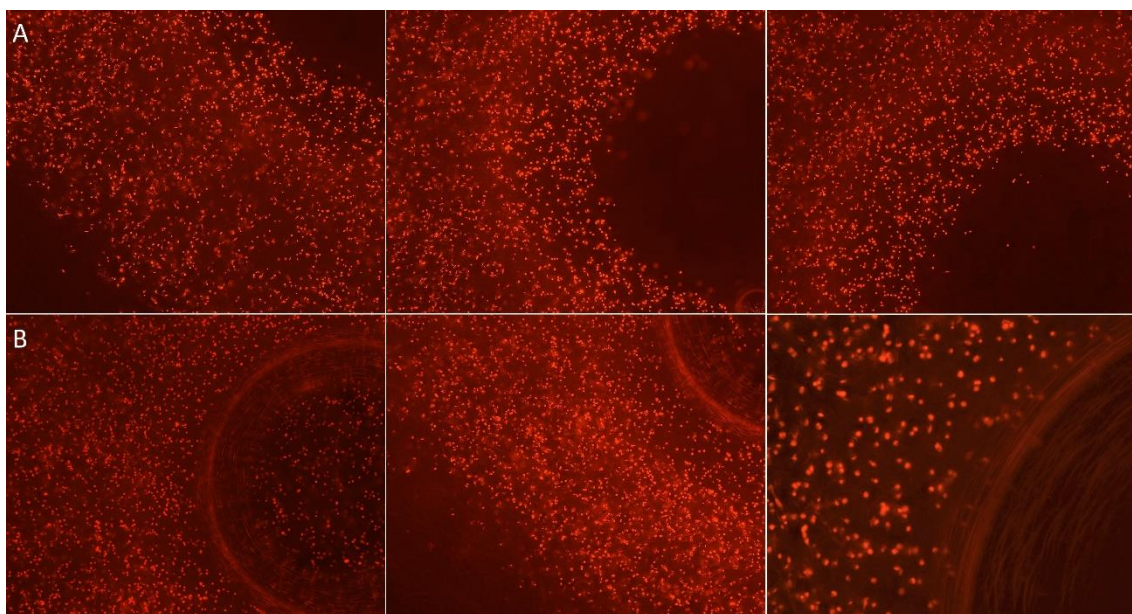
Připravená agaróza i agar byla dále ředěna 1:1 buněčnou suspenzí s médiem, čímž vznikly 10 ml roztoky 0,35% agarózy a 0,35% agaru, s koncentrací buněk $4 \cdot 10^5$. U takto připravených roztoků bylo dále změněno dávkování do vylisovaných důlků, při tomto experimentu bylo do důlků pipetováno 50 μ l, a do jednoho důlku tím bylo nadávkováno $2 \cdot 10^4$ buněk.

Nanesené buňky v agaróze a agaru byly po době zatuhnutí, zality 1 ml média a vloženy do inkubátoru, kde byly kultivovány při teplotě 37°C a 5% CO₂.

Dále u tohoto experimentu došlo ke změně testovacích dnů, místo testování během 7. a 14. dne, byly pro testování zvoleny dny: 1, 4, 8 a 14.

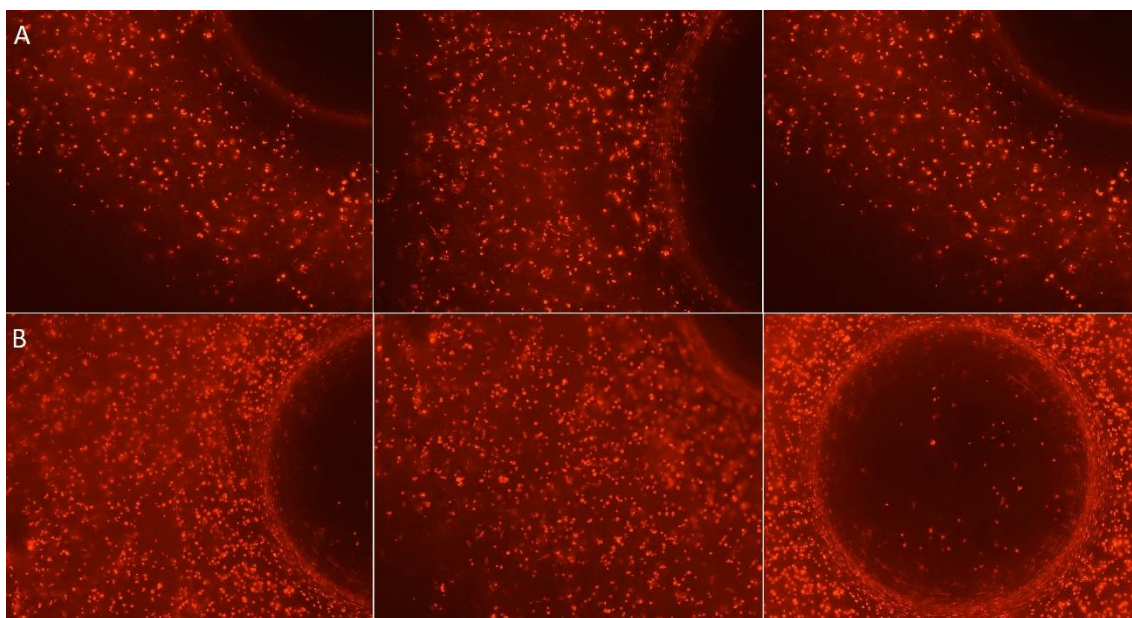
3.6.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie

Výsledky z fluorescenční mikroskopie po 1. testovacím dnu jsou zachyceny na obrázku 31. Jak lze z obrázku pozorovat, buňky po 1. testovacím dnu dokázaly přežít jak v agaróze tak i v agaru.



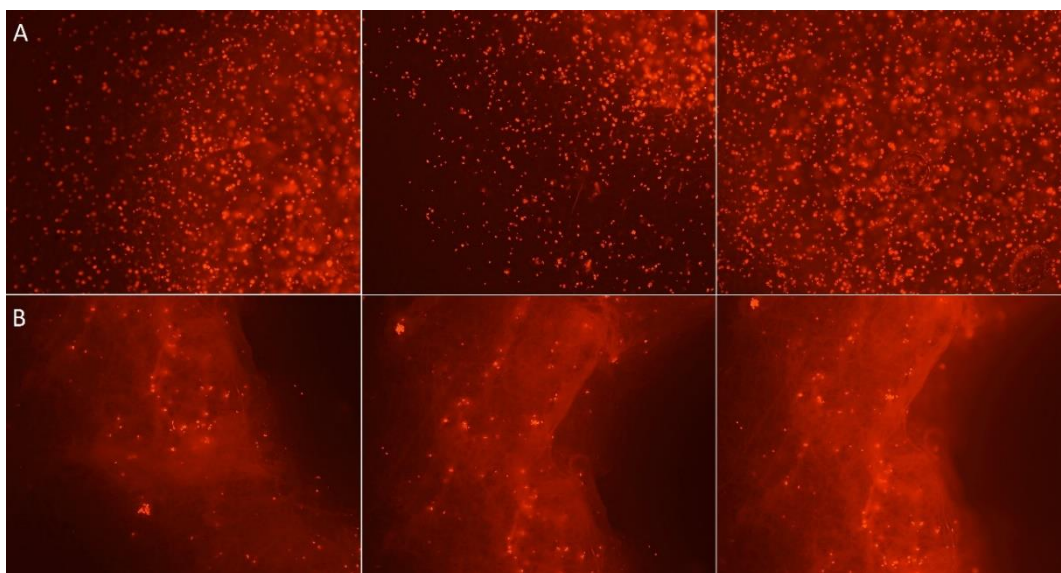
Obr. 31. Snímky agarózy a agaru z FM po 1. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.

Po 4. testovacím dnu jsou výsledky z fluorescenční mikroskopie zachyceny na obrázku 32. Z obrázku je patrné, že v testovaných materiálech nedošlo ani po 4. testovacím dnu k buněčné adhezi na vlákenný materiál a v obou materiálech dochází postupně k odumírání buněk.



Obr. 32. Snímky agarózy a agaru z FM po 4. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.

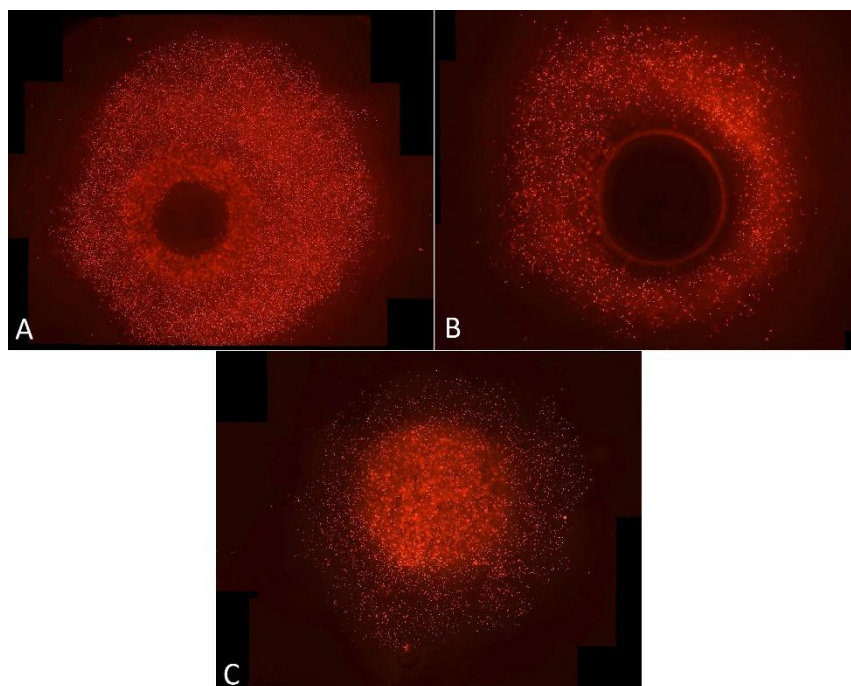
Konečné výsledky z fluorescenční mikroskopie po 8. testovacím dnu jsou na obrázku 33. Jak lze z obrázku pozorovat ani jeden testovaný materiál nedokázal umožnit buněčnou adhezi na vlákenný materiál a následnou proliferaci a migraci do použitého scaffoldu.



Obr. 33. Snímky agarózy a agaru z FM po 8. testovacím dnu. A) Buňky v agaróze, B) Buňky v agaru.

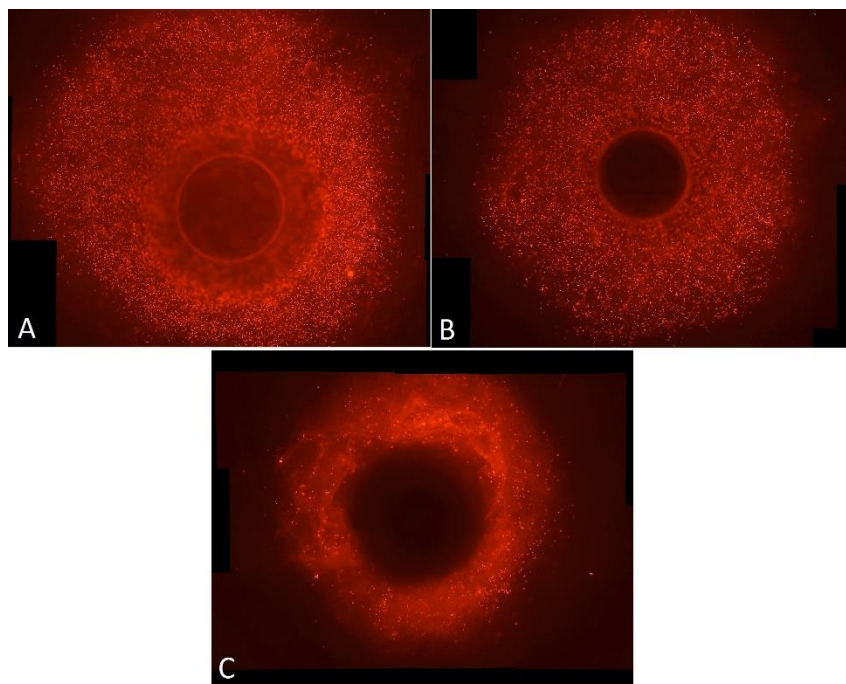
Během jednotlivých testovacích dnů byly pořizovány i jednotlivé snímky celého scaffoldu s vylisovaným důlkem. Vzniklé spojení jednotlivých snímků je na obrázku 34, v tomto případě se jedná o buňky v agaróze.

Z obrázku lze pozorovat počet i rozmístění buněk na použitém scaffoldu. Je patrné, že v agaróze během jednotlivých testovacích dnů dochází místo proliferace a migrace k postupnému odumírání buněk.



Obr. 34. Skládané snímky scaffoldu s buňkami v agaróze. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.

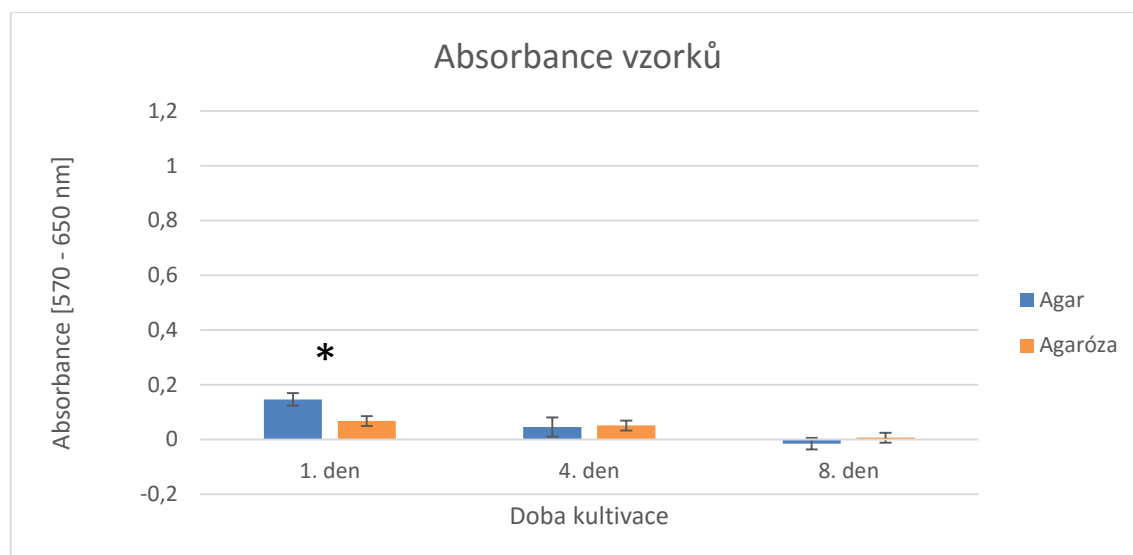
Na obrázku 35 jsou pak zachyceny skládané snímky scaffoldu osazeného buňkami v agaru. Z obrázku je patrné, že i v tomto testovaném materiálu dochází postupně během jednotlivých testovacích dnů k odumírání buněk.



Obr. 35. Skládané snímky scaffoldu s buňkami v agaru. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.

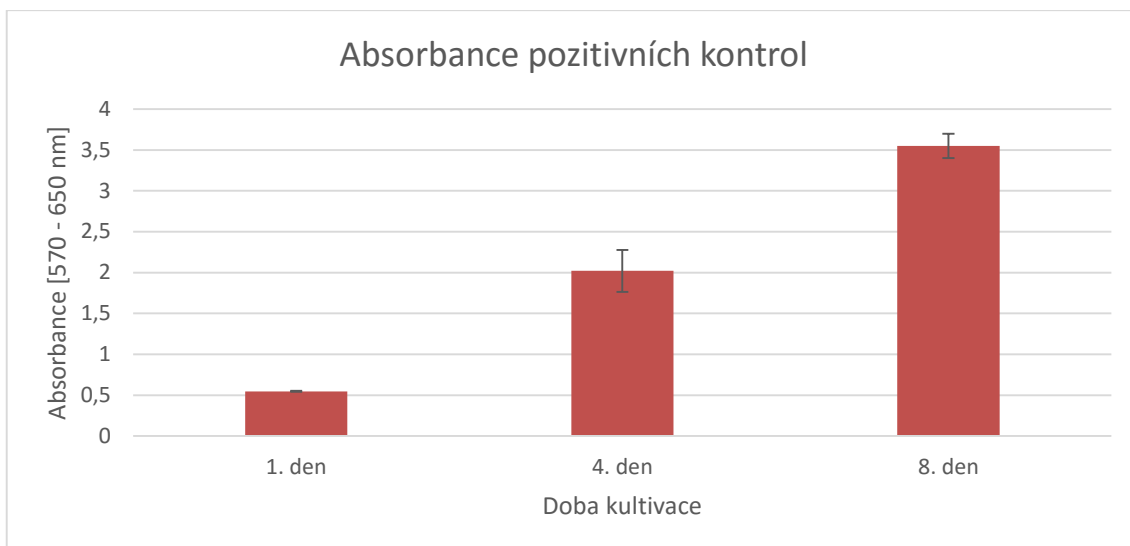
3.6.2. Výsledky MTT testu

Vyhodnocení výsledků absorbance jednotlivých materiálů probíhalo podle stejného postupu, který je uveden v kapitole 3.5.2. Výsledné absorbance jednotlivých materiálů jsou zobrazeny v grafu 3.



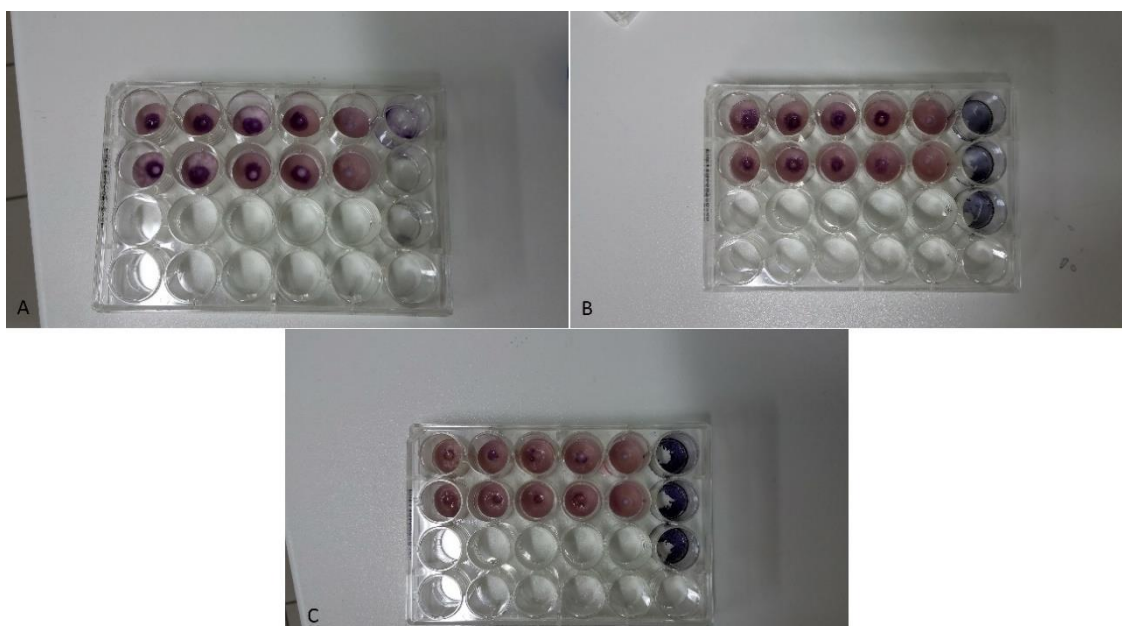
Graf 3. Výsledná absorbance pro agar, agarózu. (* značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi agarem a agarózou)

Graf výsledků MTT testu, zobrazuje absorbance vzorků pro 1., 4. a 8. den a koresponduje s výsledky z fluorescenční mikroskopie. Modře jsou znázorněny absorbance pro agar, oranžově pak pro agarózu. Výsledné hodnoty absorbance se pro agar v 1. testovacím dnu pohybují pod mezí stanovitelnosti, pro další testovací dny se absorbance snížila a pohybovala se pod mezí detekce, pro agarózu se absorbance během všech testovacích dnů pohybovala pod mezí detekce. Pro porovnání je v grafu 4 zobrazena rostoucí absorbance pozitivních kontrol.



Graf 4. Výsledné absorbance pozitivních kontrol.

Vlivem výsledků z fluorescenční mikroskopie a MTT testu byl poslední testovací den zrušen, protože jak je patrné z obrázku 36, buňky v materiálech postupně odumřely.



Obr. 36. Fotografie zachycující průběh barvení během MTT testu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den.

Z toho důvodu, že buňky postupně v obou gelech odumíraly, byl zvolen experiment s dalším materiálem, tentokrát s hydrogelem.

3.7. Testování s hydrogelem

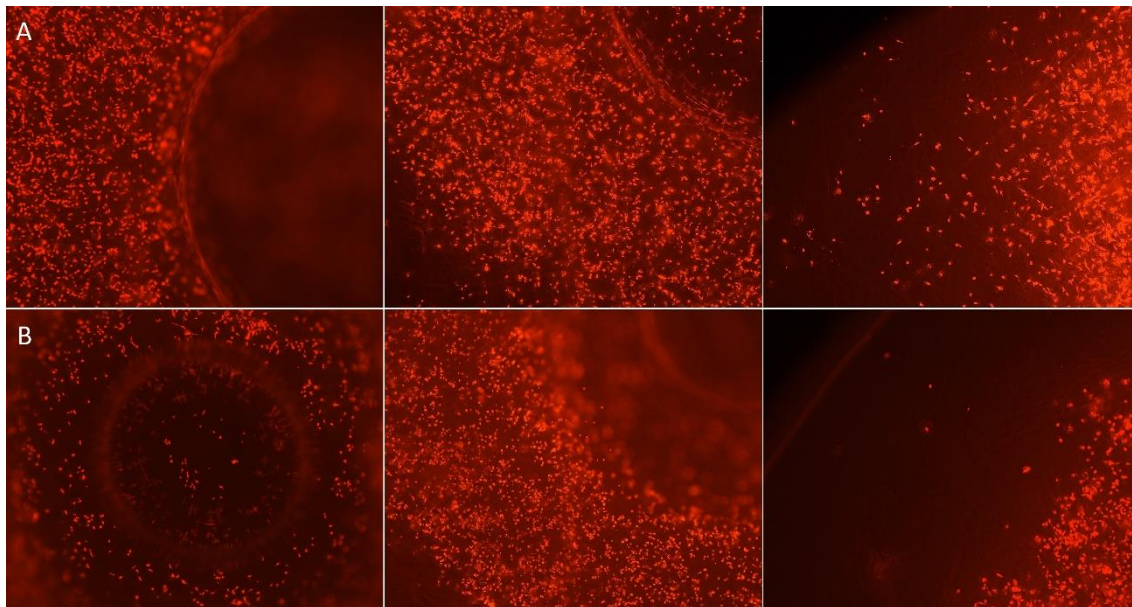
Jako konečný testovací materiál byl zvolen hydrogel HyStem[®] Hydrogel Kit od společnosti Esi·Bio. Testovací sada obsahovala 2x 50 mg Glycosilu (thiol-modifikovaná kyselina hyaluronová), Extralink[®]-Lite (polyetylen glykol diakrylát) a 10 ml DG Water (odplyněná, deionizovaná voda).

Pro přípravu hydrogelu bylo nejdříve nutné nechat jednotlivé složky sady rozmrazit při pokojové teplotě. Po rozmražení bylo následně za sterilních podmínek přidáno 5 ml DG vody do lahvičky Glycosilu. Takto připravená směs byla následně pomocí vortexu částečně promísena a dále byla vložena na 20 minut na třepačku. Po tomto promísení vznikl mírně viskózní roztok. Dále byl připraven roztok Extralink-Lite, ke kterému bylo nutné za sterilních podmínek přidat 2,5 ml DG vody a několikrát roztok promíchat. Pro samotný vznik hydrogelu bylo nutné složky Extralink-Lite a Glycosilu smíchat v poměru 1:4. Tímto způsobem vznikl roztok hydrogelu o koncentraci 0,5% s dobou gelace zhruba 30 minut.

Pro biologické testování bylo nutné nejdříve připravit roztok Glycosilu, ke kterému byla následně přidána peletka buněk, která vznikla centrifugací buněčné suspenze a následné odsátí samotného média. Pro test byly znovu použity kostní buňky MG-63 a použita byla jejich 17. pasáž. Vzniklá peletka obsahovala celkem $9,6 \cdot 10^5$ buněk a byla smíchána s roztokem Glycosilu do kterého byl následně přidán roztok Extralink-Lite. Vzniklý hydrogel s buňkami byl následně po 46 μ l dávkován opět do jednotlivých důlků v meltblownové vrstvě, do jednoho důlku bylo tak nadávkováno $1,5 \cdot 10^4$ buněk. Pro test bylo použito celkem 24 scaffoldů, opět meltblownové vrstvy uvedené v kapitole 3.2, pro každý testovací den byly připraveny 4 vzorky pro MTT test, 1 vzorek pro fluorescenční mikroskopii a 1 vzorek pro negativní kontrolu. Dále byl k testu s hydrogelem přidán i test se samotným vlákenným materiálem bez jakéhokoli gelu. Pro tento test bylo stejně jako pro test s hydrogelem připraveno 24 scaffoldů, na každý testovací den připadly 4 vzorky pro MTT test, 1 vzorek pro fluorescenční mikroskopii a 1 vzorek pro negativní kontrolu. Pro test se samotnými buňkami byla do jednotlivých důlků dávkována buněčná suspenze, s obsahem $1,5 \cdot 10^4$ buněk na důlek. Buňkami osazené materiály byly následně zality 1,5 ml média a vloženy do inkubátoru, kde byly kultivovány při teplotě 37°C a 5% CO₂.

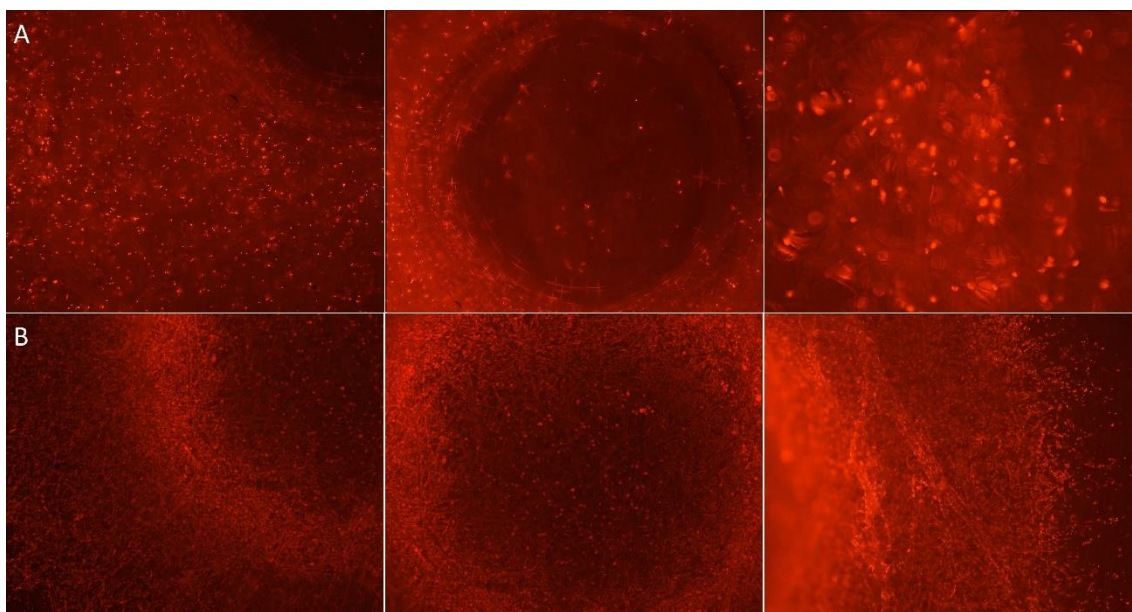
3.7.1. Výsledky fluorescenční mikroskopie

Výsledky z fluorescenční mikroskopie po 1. testovacím dnu jsou zachyceny na obrázku 37. Jak lze z obrázku pozorovat, buňky po 1. testovacím dnu v materiálech přežijí.



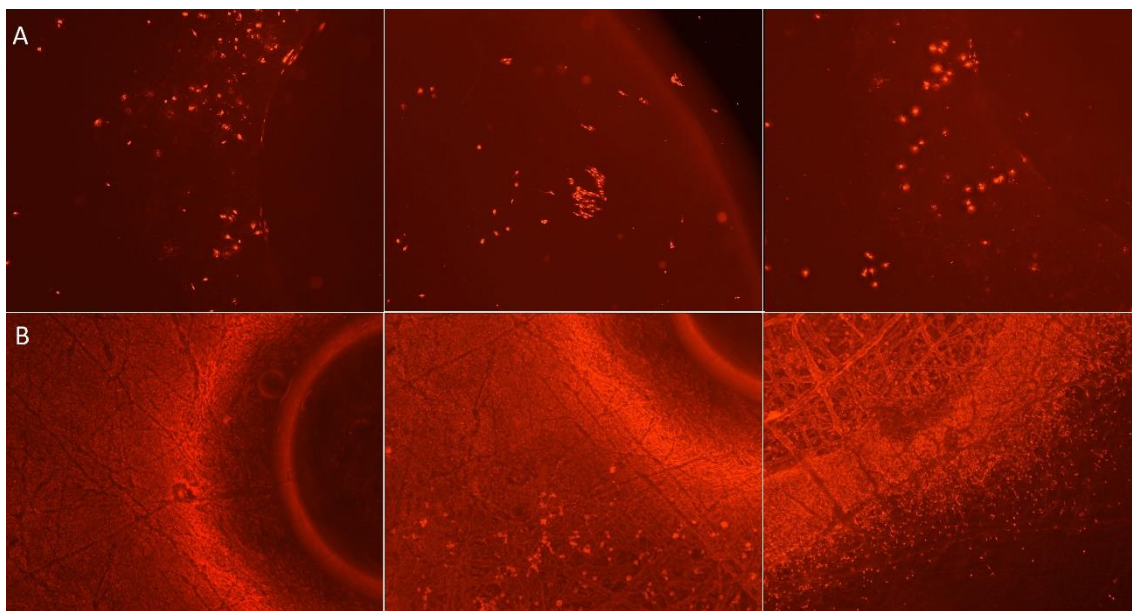
Obr. 37. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 1. testovacím dnu. A) Samotné buňky na vlákněném materiálu, B) Buňky v hydrogelu.

Po 4. testovacím dnu jsou výsledky z fluorescenční mikroskopie zachyceny na obrázku 38. Z obrázku je patrný rozdíl oproti 1. testovacímu dnu, v hydrogelu po 4. testovacím dnu došlo k adhezi buněk na vlákněný materiál a k postupné proliferaci, u samotných buněk na vlákněném materiálu nedošlo k jejich adhezi, a postupně u nich dochází k jejich odumírání.



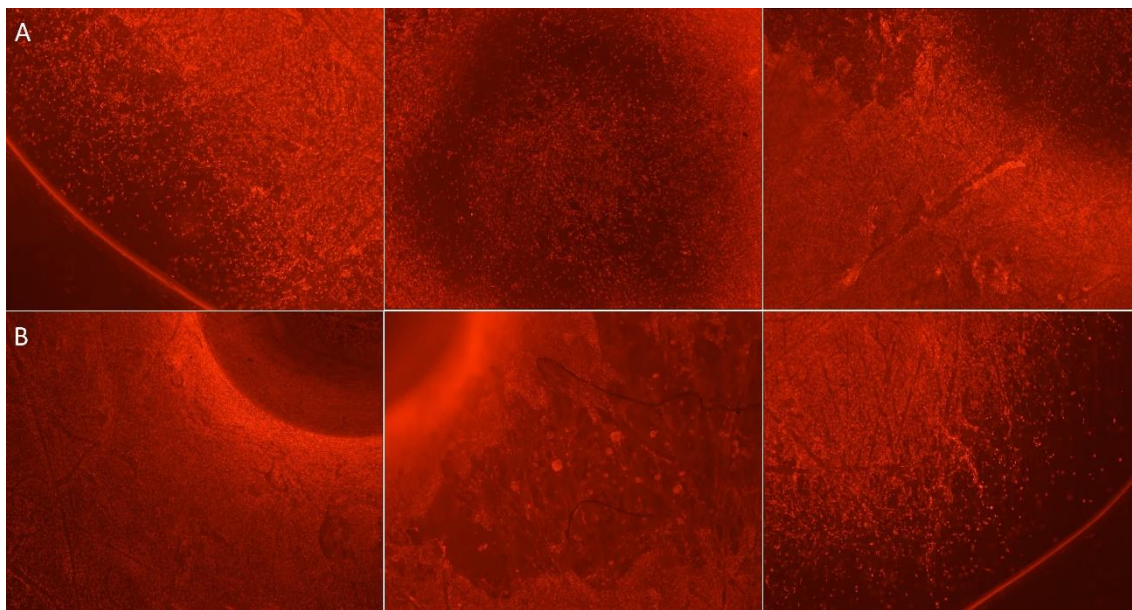
Obr. 38. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 4. testovacím dnu.
A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.

Výsledky z fluorescenční mikroskopie po 8. testovacím dnu jsou na obrázku 39. Jak lze z obrázku pozorovat, po 8. testovacím dnu došlo u hydrogelu k výrazné proliferaci buněk a k migraci do okolního vláknenného materiálu. U samotných buněk však došlo k jejich viditelnému úbytku.



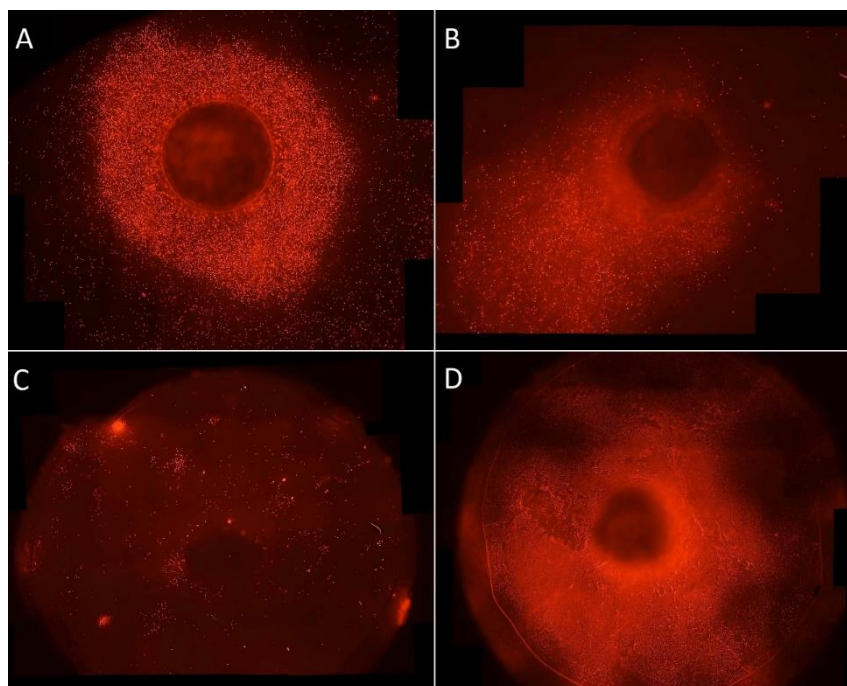
Obr. 39. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 8. testovacím dnu.
A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.

Konečné výsledky z fluorescenční mikroskopie po 14. testovacím dnu jsou zachyceny na obrázku 40. Z obrázku je patrné, že u samotných buněk došlo během posledního testovacího dne v porovnání s předchozími testovacími dny k adhezi a významné proliferaci a migraci do vláknitého materiálu, buňky v hydrogelu vykazovaly stejnou tendenci k proliferaci jako během předchozích testovacích dnů.



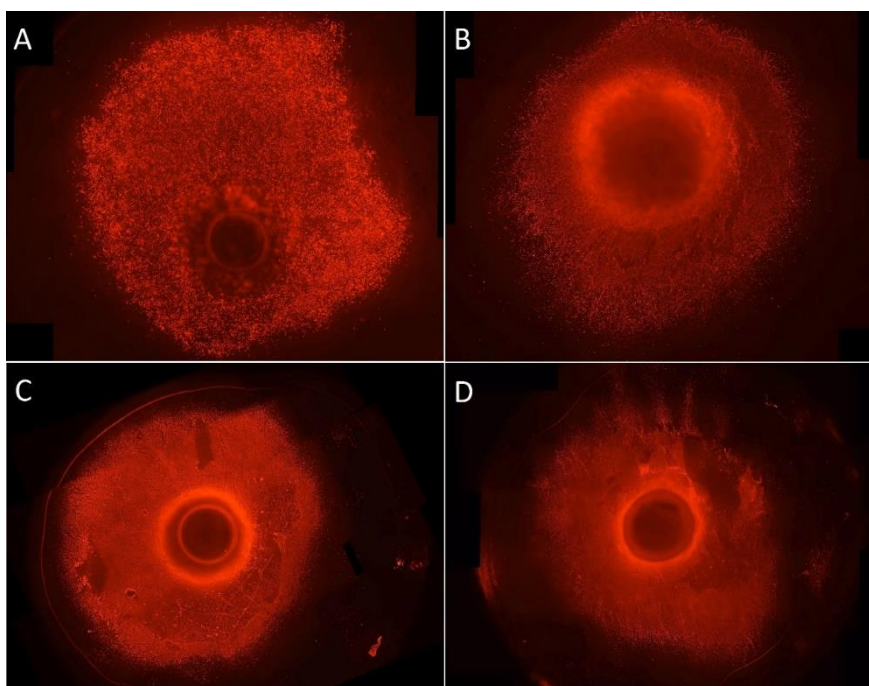
Obr. 40. Snímky samotných buněk a buněk v hydrogelu z FM po 14. testovacím dnu. A) Samotné buňky, B) Buňky v hydrogely.

Na obrázku 41 jsou zachyceny celé testované vzorky osazené samotnými buňkami. Z obrázku je patrné, že během jednotlivých testovacích dnů dochází k postupnému odumírání buněk, avšak v poslední testovací den došlo k výraznému nárůstu počtu buněk na materiálu.



Obr. 41. Skládané snímky samotných buněk na vlákenném materiálu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den, D) 14. testovací den.

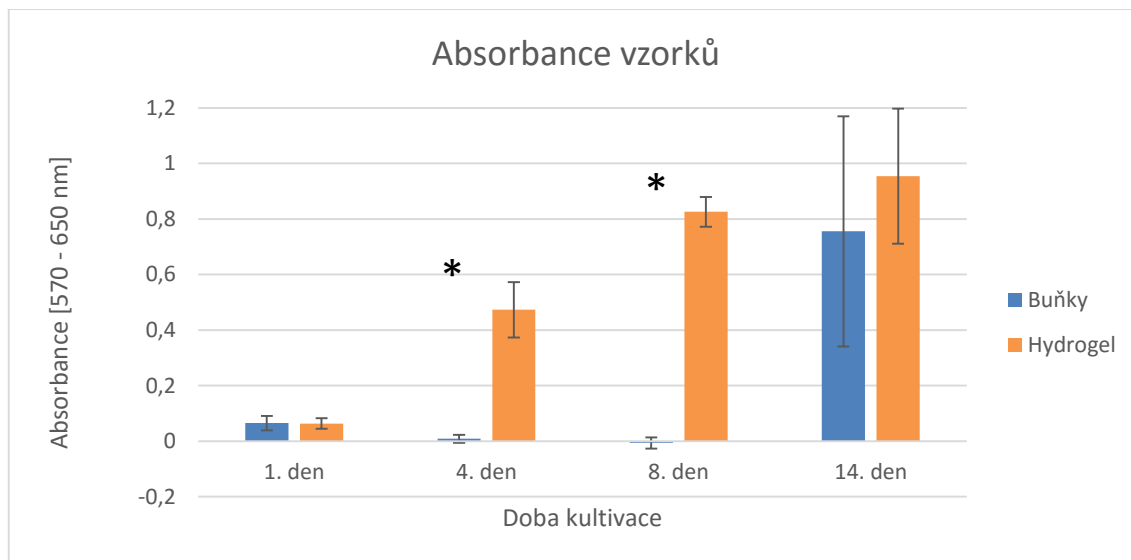
Na obrázku 42 jsou pak zachyceny skládané snímky, které jsou osazeny buňkami v hydrogelu. Z obrázku je patrné, že v hydrogelu dochází během jednotlivých testovacích dnů k postupné proliferaci a migraci buněk do vlákenného materiálu.



Obr. 42. Skládané snímky buněk v hydrogelu. A) 1. testovací den, B) 4. testovací den, C) 8. testovací den, D) 14. testovací den.

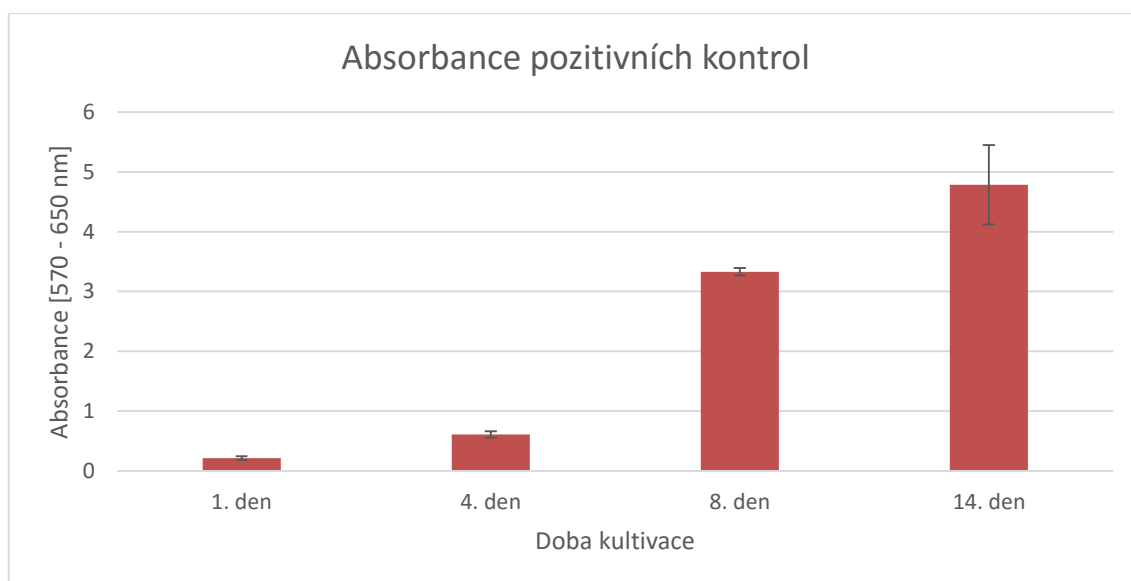
3.7.2. Výsledky MTT testu

Vyhodnocení výsledků absorbance jednotlivých materiálů probíhalo opět podle postupu, který je uveden v kapitole 3.5.2. Výsledné absorbance hydrogelu a samotného vláknenného materiálů jsou zobrazeny v grafu 5.



Graf 5. Výsledná absorbance pro hydrogel, samotné buňky a pozitivní kontroly (* značí statisticky významný rozdíl na hladině významnosti $\alpha = 0,05$ mezi hydrogelem a samotnými buňkami).

Graf výsledků z MTT testu vzorků, zobrazuje absorbance pro 1., 4., 8. a 14. den. Výsledky z MTT testu odpovídají fluorescenční mikroskopii. V grafu jsou modře znázorněny absorbance samotných buněk na vláknenném materiálu a oranžově je zachycena výsledná absorbance buněk v hydrogelu. Výsledné hodnoty absorbance se po 1. testovacím dnu pohybovali pod mezí detekce, u dalších testovacích dnů se však absorbance u hydrogelu postupně zvyšuje až do 14. testovacího dne. U samotných buněk na vláknenném materiálu se během 1., 4. a 8. testovacího dne pohybovala absorbance pod mezí detekce, avšak během posledního testovacího dne došlo k významné změně v naměřené absorbanci. Pro porovnání je v grafu 6 uvedena absorbance pozitivních kontrol, která se stejně jako u hydrogelu během jednotlivých testovacích dnů zvyšovala.



Graf 6. Výsledná absorbance pozitivních kontrol.

Z výsledků fluorescenční mikroskopie a MTT testu je patrné, že vlivem hydrogelu dochází k urychlení buněčné adheze, proliferace a migrace do vláknenného materiálu.

Získané pozitivní výsledky z testování s hydrogelem, vedly ke konečnému zvolení tohoto materiálu k samotnému tisku.

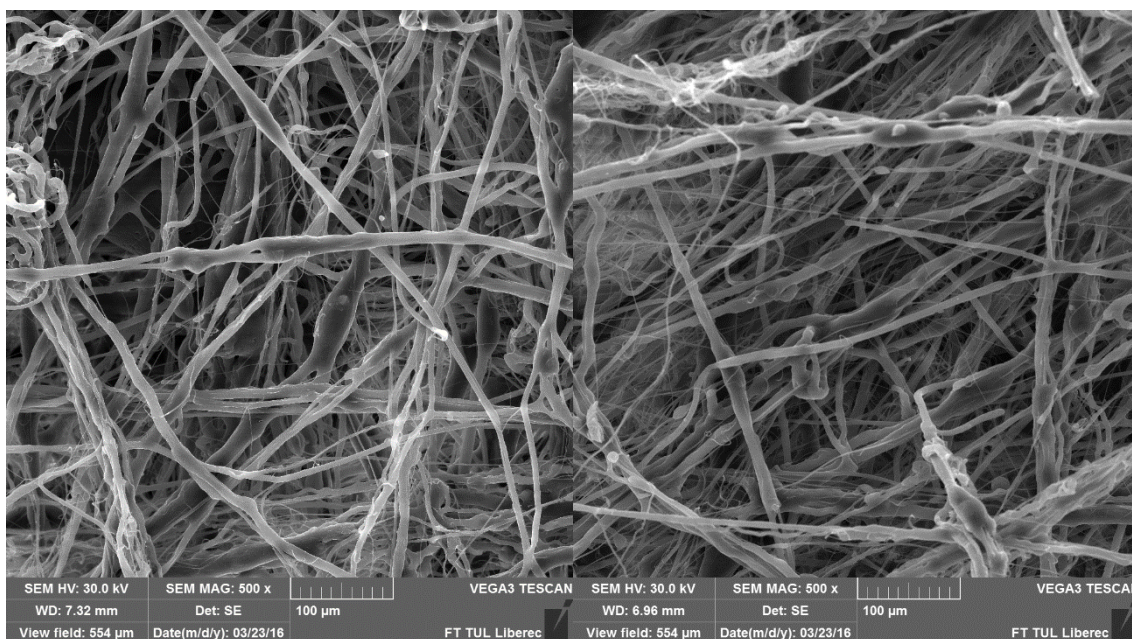
3.8. Tisk hydrogelu

Jak již bylo uvedeno výše, testování s hydrogelem vedlo k pozitivním výsledkům, a proto byl tento materiál zvolen pro tisk.

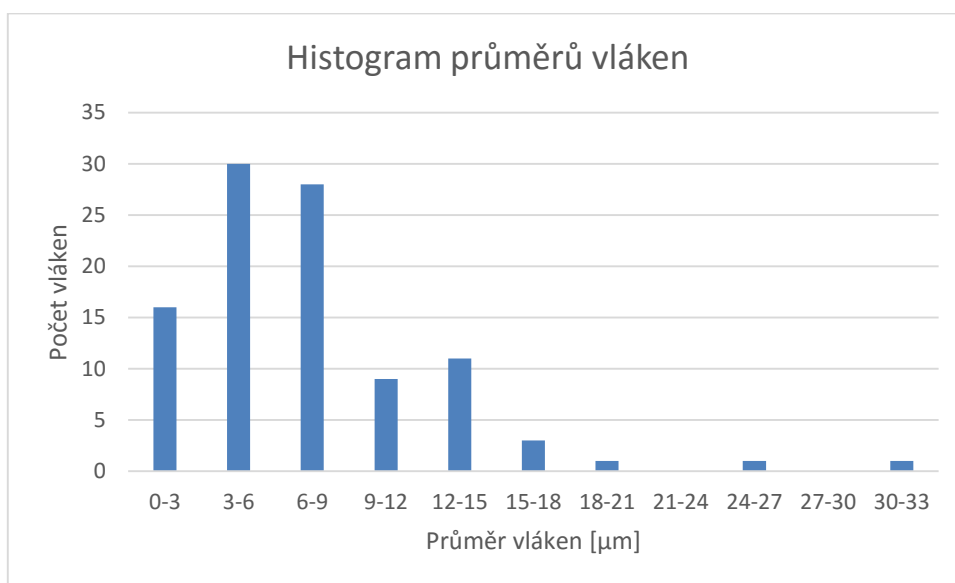
Samotný tisk byl proveden v biologické laboratoři, prvotním krokem při tomto experimentu bylo vysterilizování tiskárny. Veškeré plochy tiskárny byly otřeny 70% etanolem a následně byla celá tiskárna vložena do flowboxu a vysvícena pomocí UV záření. Dále pro samotný tisk byla zvolena skleněná stříkačka o objemu 2 ml, která byla vysterilizována autoklávem iCanclave za teploty 121°C po dobu 20 minut.

3.8.1. Charakterizace vláknenného materiálu

Pro tisk hydrogelu byl stejně jako v případě testování jednotlivých materiálů využit vláknenný materiál typu meltblown, který byl opět vyroben z polykaprolaktonu od společnosti Sigma-Aldrich. Tato vrstva, jejíž morfologie je znázorněna na obrázku 43, však byla vyrobena i s vlákny o menším průměru, jejichž průměr byl stanoven na $7,42 \pm 5,11 \mu\text{m}$. Histogram použité vláknenné vrstvy je znázorněn v grafu 7.



Obr. 43. Snímky MB vrstvy z elektronového mikroskopu, při zvětšení 500x.



Graf 7. Histogram použité vlákenné vrstvy.

Použitá vlákenná vrstva k tisku byla nadýchanější v porovnání s použitou vrstvou během testování. Pro testování byla vrstva seříznuta na tloušťku 7 mm a nebyly do ní vylisovány důlky.

3.8.2. Postup tisku

Pro tisk byl připraven hydrogel a buněčná peletka, jejichž příprava je popsána v kapitole 3.7.. K tisku byly stejně jako v případě testování znovu použity kostní buňky MG-63 a použita byla jejich 14. pasáž. Pro tisk bylo připraveno 4,5 ml buněčné suspenze, ve které bylo celkem $2 \cdot 10^6$ buněk. Z této buněčné suspenze bylo do každé jamky pro pozitivní kontroly nadávkováno 34 μ l suspenze, díky tomu v jedné jamce bylo $1,5 \cdot 10^4$ buněk. Pro tisk do vlákenného materiálu byl připraven hydrogel s buňkami, který byl následně po 45 μ l tisknut do středu objemu meltblownové vrstvy, tak jak je znázorněno na obrázku 44. Do jednoho scaffoldu tím bylo vtisknuto $1,5 \cdot 10^4$ buněk. Pro test bylo znovu použito celkem 24 scaffoldů, pro každý testovací den byly připraveny 4 vzorky pro MTT test, 1 vzorek pro fluorescenční mikroskopii a 1 vzorek pro negativní kontrolu. Osazené scaffoldy i pozitivní kontroly byly následně zality 1,5 ml média a vloženy do inkubátoru, kde byly kultivovány při teplotě 37°C a 5% CO₂.

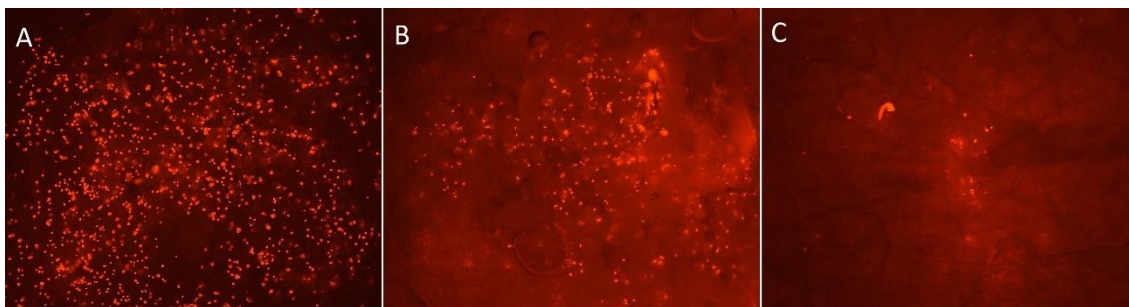


Obr. 44. Zkušební vtisknutí obarvené vody do středu objemu meltblownové vrstvy.

Během tisku však došlo k technickým potížím s tiskárnou, které vedly k časové prodlevě, během které došlo ke zgelování hydrogelu ještě ve stříkačce. Tištěn tedy nebyl roztok, který by se rozprostřel po okolních vláknech, nýbrž již hotový gel.

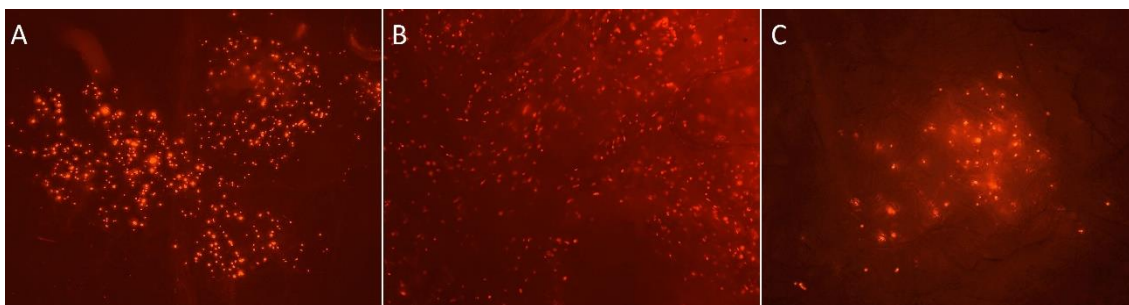
3.8.3. Výsledky fluorescenční mikroskopie

Výsledky fluorescenční mikroskopie pro 1. testovací den jsou na obrázku 45. Ze snímků je patrné jak během tisku došlo k rozmístění buněk skrz celý testovaný scaffold.



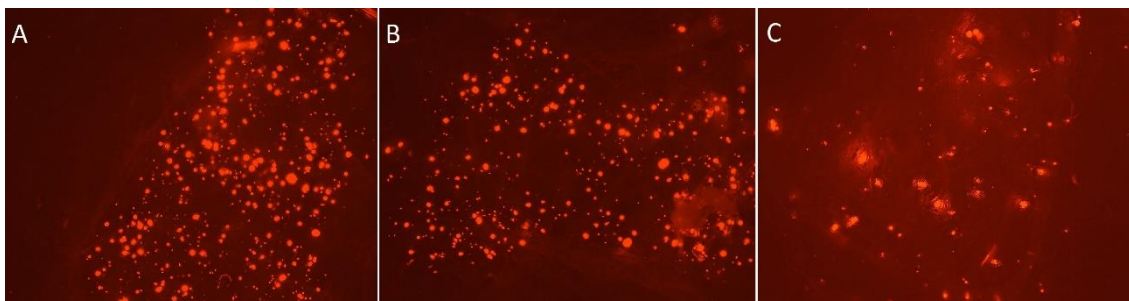
Obr. 45. Snímky buněk v hydrogelu po 1. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.

Pro 4. testovací den jsou výsledky fluorescenční mikroskopie na obrázku 46. Ze snímků lze pozorovat, že i v tomto případě došlo během tisku k rozmístění buněk skrz testovaný scaffold. Avšak při porovnání s výsledky z kapitoly 3.7.1., je patrné, že v tomto případě nedochází k buněčné adhezi a proliferaci.



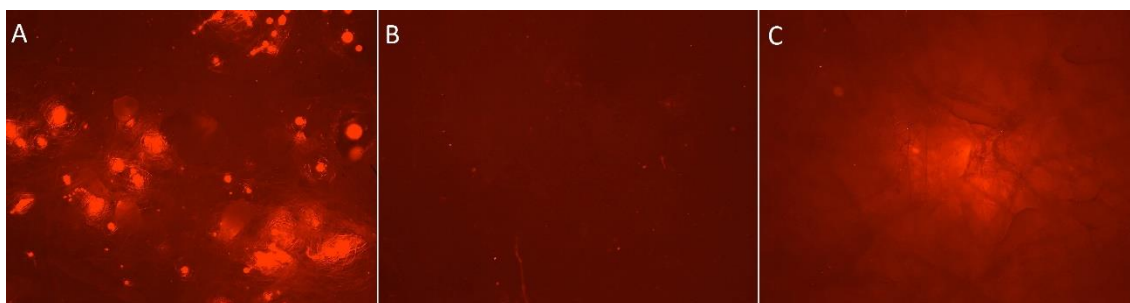
Obr. 46. Snímky buněk v hydrogelu po 4. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.

Výsledky 8. testovacího dnu z fluorescenční mikroskopie jsou na obrázku 47. Ze snímků je patrné, že vlivem tisku gelu nedošlo ani po 8. dnu kultivace k buněčné adhezi a proliferaci.



Obr. 47. Snímky buněk v hydrogelu po 8. testovacím dnu. A) Buňky na povrchu scaffoldu, B) Buňky ve středu objemu scaffoldu, C) Buňky na spodní straně scaffoldu.

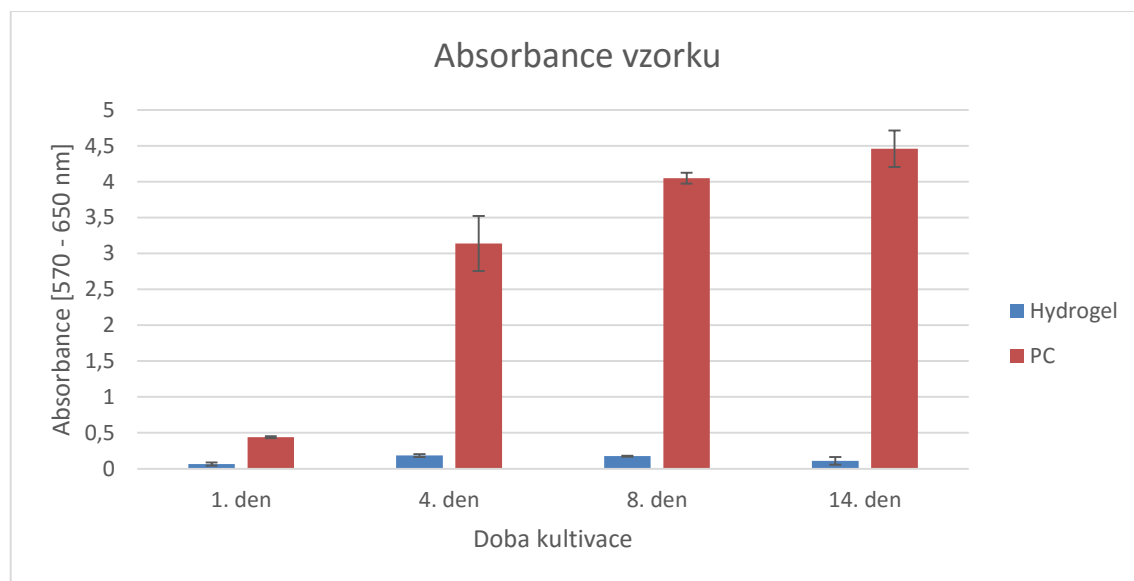
Konečné výsledky po 14. testovacím dnu jsou na obrázku 48. Ze snímků je patrné, že vlivem tisku gelu nedošlo po celou dobu kultivace k buněčné adhezi a proliferaci do okolního vláknenného materiálu.



Obr. 48. Snímky testovaného scaffoldu po 14. testovacím dnu. A) Povrchu scaffoldu, B) Střed objemu scaffoldu, C) Spodní strana scaffoldu.

3.8.4. Výsledky MTT testu

Výsledné absorbance tisknutého hydrogelu a pozitivních kontrol jsou zobrazeny v grafu 8. Vyhodnocení těchto výsledků proběhlo opět podle postupu, který je uveden v kapitole 3.5.2.



Graf 8. Výsledná absorbance tisknutého hydrogelu.

Graf výsledků MTT testu, koresponduje s výsledky z fluorescenční mikroskopie. Výsledná absorbance hydrogelu po 1. testovacím dnu byla pod mezí detekce. Absorbance se během 4. testovacího dne mírně zvýšila, avšak její výsledná hodnota byla pod mezí stanovitelnosti. Během dalších testovacích dnů již nedošlo k žádným změnám a absorbance byla i během těchto testovacích dnů pod mezí stanovitelnosti.

4. Závěr

Tato diplomová práce je zaměřená na využití buněčného tisku k přípravě biologických kompozitních materiálů. V rešeršní části práce byly popsány způsoby tisku a jeho současné využití při tisku tkání. Pozornost byla ale věnována i materiálům, které lze při samotném tisku využít. Experimentální část práce lze rozdělit na tři části a jejím vypracováním bylo splněno zadání diplomové práce.

První část experimentu byla zaměřena na kalibraci tiskárny. Při testování základních možností tiskárny byly zjištěny její různé nedokonalosti a chyby, které bylo nutné eliminovat. Největší problémy byly zjištěny u nastavení z-tové osy, u které bylo nutné upravit uložení vodící tyče, zajištění pevného spojení mezi motory a ovládacími hřídelemi, a také vytvoření nové zarážky k optickému snímači.

Druhá část experimentu byla zaměřena na výběr vhodného materiálu, který by bylo možné tisknout a zároveň by podpořil buněčnou adhezi a proliferaci. Pro otestování byly vybrány čtyři materiály, a to: želatina, agaróza, agar a hydrogel, které byly aplikovány na meltblownovou vrstvu z biokompatibilního polykaprolaktonu. Při samotném tisku želatiny byla nejdříve udělána koncentrační řada (15%, 20% a 25%) pro zvolení vhodné koncentrace, která by nezpůsobila problémy při tisku. Tisk želatiny o zvolené vhodné koncentraci (20%) byl proveden na vlákenný materiál, díky kterému vznikl kompozitní materiál. Biologický experiment však ukázal, že testovaná želatina nelze v podmínkách biologické laboratoře sterilizovat a pro použití v tkáňovém inženýrství je tedy nevhodná. Dále bylo provedeno testování agarózy a agaru. Stejně jako u experimentu se želatinou, byla nejdříve udělána koncentrační řada (0,10%, 0,15%, 0,20%, 0,25%, 0,30%, 0,35% a 0,50%) pro zjištění vhodné koncentrace k tisku. Po zvolení vhodných koncentrací (0,35%) u obou materiálů bylo provedeno in-vitro testování, které vedlo k neuspokojivým výsledkům. Materiály neumožnily buněčnou adhezi a proliferaci. Poslední testovaný materiál: hydrogel, byl dle postupu předepsané přípravy od výrobce připraven jen o 0,5% koncentraci. In-vitro testování s hydrogelem vedlo ke zjištění, že hydrogel umožňuje a zároveň i urychluje buněčnou adhezi a proliferaci.

Třetí část práce je přímo zaměřena na přípravu kompozitního materiálu pomocí buněčného tisku. Při experimentu byl vytvořen kompozitní biologický materiál, který obsahoval mikro/nano vlákennou vrstvu z polykaprolaktonu a hydrogel.

Vlivem technických potíží s tiskárnou však byl hydrogel tisknut již jako gel. Při in-vitro testování bylo zjištěno, že k podpoření buněčné viability, je nutné hydrogel tisknout ještě ve formě roztoku.

Pro další testování navrhuji opakovat celý proces tisku gelu, aby došlo k jeho zdokonalení a urychlení. Dále pro testování navrhuji výzkum pro vytvoření scaffoldu, který by umožňoval kombinaci několika buněčných kultur. Pro tento experiment by bylo vhodné upravit stávající zařízení tak, aby umožnilo vytlačování ze dvou extrudérů, díky čemuž by se usnadnila kombinace materiálů.

Použitá literatura

- [1] Mironov, V. Organ printing: Tissue spheroids as building blocks. *Biomaterials*, 2009, č. 30, s. 2164-2174.
- [2] What Is a Cell - Learn Science at Scitable [online]. c2014, last revision 15th of April 2015 [cit. 2015-04-24]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.nature.com/scitable/topicpage/what-is-a-cell-14023083>>.
- [3] Murphy, V. S., Atala, A. 3D bioprinting of tissues and organs. *Nature Biotechnology*, 2014, č. 32, s. 773–785.
- [4] Boland, T. Application of inkjet printing to tissue engineering. *Biotechnol.* 2006. Vol. 1, s. 910-917.
- [5] Jakab, K. Tissue engineering by self-assembly and bio-printing of living cells. *Biofabrication* 2, 2010.
- [6] Nousek, P. Princip tisku inkoustových tiskáren : závěrečná ročníková práce. Tábor : Střední průmyslová škola strojnická Tábor, 2005. 19 l. Vedoucí práce Pavel Musila.
- [7] Cis, B. T. Tuổi 20 của công nghệ in phun Epson Micro Piezo [online]. c2014, last revision 25th of April 2015 [cit. 2015-04-25]. Dostupné na World Wide Web: <<http://cisbaotin.tabweb.vn/tin-tuc/2B104C/tuoi-20-cua-cong-nghe-in-phun-epson-micro-piezo.aspx>>.
- [8] Saunders, R. Inkjet printing biomaterials for tissue engineering: bioprinting. *International Materials Reviews*, 2014, vol. 59, no. 8, s. 430-447.
- [9] 3D printer extruder - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. c2014, last revision 26th of March 2015 [cit. 2015-04-25]. Dostupné na World Wide Web: <http://en.wikipedia.org/wiki/3D_printer_extruder>.
- [10] Patrascioiu, A. Microdroplet deposition through a film-free laser forward printing technique. *Applied Surface Science*, 2012, vol. 258, s. 9412-9416.
- [11] Laser Assisted Bioprinting - TEAL: Tissue Engineering Assisted by Laser [online]. c2010, last revision 3th of January 2010 [cit. 2015-10-16]. Dostupné na World Wide Web: <<http://www.teal.u-bordeaux2.fr/research-axes/laser-assisted-bioprinting/?lang=en>>.
- [12] Catros, S. Effect of laser energy, substrate film thickness and bioink viscosity on viability of endothelial cells printed by Laser-Assisted Bioprinting. *Applied Surface Science*, 2011, vol. 257, s. 5142-5147.

- [13] Seol, Y. J. Bioprinting technology and its applications. *European Journal of Cardio-Thoracic Surgery*, 2014, vol. 46, s. 342-348.
- [14] Slaughter, V. B. Hydrogels in Regenerative Medicine. *Advanced materials*, 2009, vol. 21, s. 3307-3329.
- [15] Hoare, R. T. Hydrogels in drug delivery: Progress and challenges. *Polymer*, 2008, vol. 49, s. 1993-2007.
- [16] Murphy, V. Sean. Evaluation of hydrogels for bio-printing applications. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013, s. 272–284.
- [17] Nicholas, A. P. Hydrogels in Biology and Medicine: From Molecular Principles to Bionanotechnology. *Advanced Materials*, 2006, vol. 18, s. 1345-1360.
- [18] Researchers Use DNA as ‘Smart Glue’ to Provide Structure for 3D Bio-Printing - 3DPrint.com [online]. c2015, [cit. 29. března 2015]. Dostupné na World Wide Web: <<http://3dprint.com/37388/dna-smart-glue/>>.
- [19] Yu, Y. Z. Fabrication of hierarchical polycaprolactone/gel scaffolds via combined 3D bioprinting and electrospinning for tissue engineering. *Adv. Manuf.* 2, 2014, s. 231-238.
- [20] Duan, B. 3D Bioprinting of heterogeneous aortic valve conduits with alginate/gelatin hydrogels. *J Biomed Mater Res Part A*, 2013, s. 1255–1264.
- [21] Aorta - Wikipedia, the free encyclopedia [online]. c2005, last revision 21th of April 2015 [cit. 2015-04-26]. Dostupné na World Wide Web: <<http://en.wikipedia.org/wiki/Aorta>>.
- [22] Pslsson, B. Tissue Enginnering. *Tissue Engineering*. Florida : CRC Press, 2003. 392 s. ISBN 0-8493-1812-2.
- [23] Kucukgul, C. 3D Bioprinting of Biomimetic Aortic Vascular Constructs With Self-Supporting Cells, *Biotechnology and Bioengineering*, 2015, Vol. 112, No. 4, s. 811-821.
- [24] Skardal, A. Bioprinting vessel-like constructs using hyaluronan hydrogels crosslinked with tetrahedral polyethylene glycol tetracrylates. *Biomaterials*. 2010. vol. 31. s. 6173-6181.
- [25] Koch, L. Bioprinting for Skin, *3D Bioprinting and Nanotechnology in Tissue Engineering and Regenerative Medicine*, 2015, s. 281-306.
- [26] Koch, L. Skin Tissue Generation by Laser Cell Printing, *Biotechnology and Bioengineering*, 2012, Vol. 109, No. 7, s. 1855-1863.

- [27] New Skin Printer Could Print You Some New Skin | Singularity HUB [online]. c2010, last revision 20th of March 2014 [cit. 2015-04-25]. Dostupné na World Wide Web: < <http://singularityhub.com/2010/11/04/wake-forest-could-print-you-some-new-skin/>>.
- [28] Bose, S. Bone tissue engineering using 3D printing, *Materials Today*, 2013, vol. 16, no. 12, s. 496-504.
- [29] Gao, G. Bioactive nanoparticles stimulate bone tissue formation in bioprinted three-dimensional scaffold and human mesenchymal stem cells. *Biotechnol. J.*, 2014, vol. 9, s. 1304–1311.
- [30] Lorber, B. Adult rat retinal ganglion cells and glia can be printed by piezoelectric inkjet printing. *Biofabrication* 6, 2014.
- [31] Organovo's 1st 3D Printed Kidney Tissue - 3D Printing Industry [online]. c2015, last revision 20th of April 2015 [cit. 2015-04-26]. Dostupné na World Wide Web: <<http://3dprintingindustry.com/2015/04/01/organovo-announces-its-first-3d-bioprinted-kidney-tissue/>>.
- [32] Scientists Can Now 3D Print Transplantable, Living Kidneys [online]. c2013, last revision 20th of April 2014 [cit. 2015-04-26]. Dostupné na World Wide Web: <<http://gizmodo.com/scientists-can-now-3d-print-transplantable-living-kidn-1120783047>>.
- [33] Volponi, A. A. Stem cell-based biological tooth repair and regeneration. *Trends in Cell Biology*. 2010, s. 715-722.
- [34] Yang, K. C. Dental Field and Maxillofacial Area. *Journal of tissue engineering and regenerative medicine*. 2012, s. 1-429.
- [35] Kim, K. Anatomically Shaped Tooth and Periodontal Regeneration by Cell Homing. *J Dent Res*, 2010, vol. 89, s. 842-847.
- [36] Johnson, N. B. 3D Printed Anatomical Nerve Regeneration Pathways. *Advanced Functional Materials*, 2015, vol. 25, p. 6205-6217.
- [37] Woodruff, A. M. The return of a forgotten polymer—Polycaprolactone in the 21st century. *Progress in Polymer Science*, 2010, č. 35, s. 1217–1256.
- [38] Mark, J. E. *Polymer Data Handbook*. 2nd. ed. New York: Oxford University Press, 2009. 1250 p. ISBN 978-0-19-518101-2.
- [39] Members of the GMIA, *Gelatin Handbook*, 2012. 26s.
- [40] Home - United States Biological [online]. c2015 [cit. 17. listopadu 2015]. Dostupný na World Wide Web: < <https://www.usbio.net/misc/newsletter120109>>.

- [41] Cambrex Bio Science Rockland, Inc. Maine, The sourcebook. A Handbook for Gel Electrophoresis, 2010. 278s.
- [42] AgarGel, Agar-Agar : Properties and Specifications [online]. c2003, last revision 30th of December 2011 [cit. 3. března 2016]. Dostupný na World Wide Web: <<http://www.agargel.com.br/agar-tec-en.html>>.
- [43] All About Agar [online]. c2013 [cit. 3. března 2016]. Dostupný na World Wide Web: <http://www.sciencebuddies.org/science-fair-projects/project_ideas/MicroBio_Agar.shtml>.
- [44] Paleos, G. A. What are Hydrogels? Pittsburgh Plastics Manufacturing, Butler, 2012.
- [45] Stockert, J. C. MTT assay for cell viability: Intracellular localization of the formazan product is in lipid droplets. Acta Histochemica, 2012, vol. 114, p. 785-796.
- [46] Frei, M. Cell Viability and Proliferation. Biofiles, vol. 6, no 5, p. 17-21.
- [47] Barkhordari, A. The Toxic Effects of Silver Nanoparticles on Blood Mononuclear Cells. The International Journal of Occupational and Environmental Medicine, 2014, vol. 5, no. 3, p. 164-168.
- [48] Fluorescence Microscopy [online]. c2011, last revision 24th of February 2011 [cit. 3. března 2016]. Dostupné na World Wide Web: <http://www.gonda.ucla.edu/bri_core/fluoresc.htm>.
- [49] Rice, G. Fluorescent Microscopy [online]. c2013, last revision 19th November 2013 [cit. 3. března 2016]. Dostupné na World Wide Web: <http://serc.carleton.edu/microbelife/research_methods/microscopy/fluoromic.html>.
- [50] Gree, D. A. The History and Working Principle of the Scanning Electron Microscope (SEM), 2015.